

# **NNR-STEROIDOGENESE IM SCHOCK**

**Regulation und Funktion von Cholesterin, Progesteron,  
11-Desoxycorticosteron und 17-OH-Progesteron bei Hundewelpen  
im unbehandelten und im mit hohen Aldosterondosen therapierten  
standardisierten hämorrhagischen Schock**

**Methodik und Ergebnisse**

**Werner Golder**

**1977**



AUS DER KINDERCHIRURGISCHEN KLINIK DER KINDERKLINIK  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN IM DR. VON HAUNERSCHEN KINDERSPITAL

Direktor: Professor Dr.W.Ch. Hecker

---

## NNR - STERIDOGENESE IM SCHOCK

Regulation und Funktion von Cholesterin, Progesteron ,  
11-Desoxycorticosteron und 17-OH-Progesteron bei Hunde-  
welpen im unbehandelten und im mit hohen Aldosterondo-  
sen therapierten standardisierten hämorrhagischen Schock

Methodik und Ergebnisse



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Werner Golder

aus

München

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Hollmann

Mitberichterstatter: Professor Dr. W. Ch. Hecker

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

**10. MAI 1977**

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

|       |                             |     |
|-------|-----------------------------|-----|
| 1.1   | Einleitung                  | 1   |
| 1.2   | Methoden und Vorgehensweise | 2   |
| 1.3   | Erhebungsinstrumente        | 3   |
| 1.4   | Statistische Verfahren      | 4   |
| 1.5   | Ergebnisse und Diskussion   | 5   |
| 1.6   | Fazit und Ausblick          | 6   |
| 1.7   | Literaturverzeichnis        | 7   |
| 1.8   | Anhang                      | 8   |
| 1.9   | Danksagung                  | 9   |
| 1.10  | Abkürzungen                 | 10  |
| 1.11  | Lebenslauf                  | 11  |
| 1.12  | Curriculum Vitae            | 12  |
| 1.13  | Zeugnis                     | 13  |
| 1.14  | Bestätigung                 | 14  |
| 1.15  | Erklärung                   | 15  |
| 1.16  | Unterschied                 | 16  |
| 1.17  | Erklärung                   | 17  |
| 1.18  | Erklärung                   | 18  |
| 1.19  | Erklärung                   | 19  |
| 1.20  | Erklärung                   | 20  |
| 1.21  | Erklärung                   | 21  |
| 1.22  | Erklärung                   | 22  |
| 1.23  | Erklärung                   | 23  |
| 1.24  | Erklärung                   | 24  |
| 1.25  | Erklärung                   | 25  |
| 1.26  | Erklärung                   | 26  |
| 1.27  | Erklärung                   | 27  |
| 1.28  | Erklärung                   | 28  |
| 1.29  | Erklärung                   | 29  |
| 1.30  | Erklärung                   | 30  |
| 1.31  | Erklärung                   | 31  |
| 1.32  | Erklärung                   | 32  |
| 1.33  | Erklärung                   | 33  |
| 1.34  | Erklärung                   | 34  |
| 1.35  | Erklärung                   | 35  |
| 1.36  | Erklärung                   | 36  |
| 1.37  | Erklärung                   | 37  |
| 1.38  | Erklärung                   | 38  |
| 1.39  | Erklärung                   | 39  |
| 1.40  | Erklärung                   | 40  |
| 1.41  | Erklärung                   | 41  |
| 1.42  | Erklärung                   | 42  |
| 1.43  | Erklärung                   | 43  |
| 1.44  | Erklärung                   | 44  |
| 1.45  | Erklärung                   | 45  |
| 1.46  | Erklärung                   | 46  |
| 1.47  | Erklärung                   | 47  |
| 1.48  | Erklärung                   | 48  |
| 1.49  | Erklärung                   | 49  |
| 1.50  | Erklärung                   | 50  |
| 1.51  | Erklärung                   | 51  |
| 1.52  | Erklärung                   | 52  |
| 1.53  | Erklärung                   | 53  |
| 1.54  | Erklärung                   | 54  |
| 1.55  | Erklärung                   | 55  |
| 1.56  | Erklärung                   | 56  |
| 1.57  | Erklärung                   | 57  |
| 1.58  | Erklärung                   | 58  |
| 1.59  | Erklärung                   | 59  |
| 1.60  | Erklärung                   | 60  |
| 1.61  | Erklärung                   | 61  |
| 1.62  | Erklärung                   | 62  |
| 1.63  | Erklärung                   | 63  |
| 1.64  | Erklärung                   | 64  |
| 1.65  | Erklärung                   | 65  |
| 1.66  | Erklärung                   | 66  |
| 1.67  | Erklärung                   | 67  |
| 1.68  | Erklärung                   | 68  |
| 1.69  | Erklärung                   | 69  |
| 1.70  | Erklärung                   | 70  |
| 1.71  | Erklärung                   | 71  |
| 1.72  | Erklärung                   | 72  |
| 1.73  | Erklärung                   | 73  |
| 1.74  | Erklärung                   | 74  |
| 1.75  | Erklärung                   | 75  |
| 1.76  | Erklärung                   | 76  |
| 1.77  | Erklärung                   | 77  |
| 1.78  | Erklärung                   | 78  |
| 1.79  | Erklärung                   | 79  |
| 1.80  | Erklärung                   | 80  |
| 1.81  | Erklärung                   | 81  |
| 1.82  | Erklärung                   | 82  |
| 1.83  | Erklärung                   | 83  |
| 1.84  | Erklärung                   | 84  |
| 1.85  | Erklärung                   | 85  |
| 1.86  | Erklärung                   | 86  |
| 1.87  | Erklärung                   | 87  |
| 1.88  | Erklärung                   | 88  |
| 1.89  | Erklärung                   | 89  |
| 1.90  | Erklärung                   | 90  |
| 1.91  | Erklärung                   | 91  |
| 1.92  | Erklärung                   | 92  |
| 1.93  | Erklärung                   | 93  |
| 1.94  | Erklärung                   | 94  |
| 1.95  | Erklärung                   | 95  |
| 1.96  | Erklärung                   | 96  |
| 1.97  | Erklärung                   | 97  |
| 1.98  | Erklärung                   | 98  |
| 1.99  | Erklärung                   | 99  |
| 1.100 | Erklärung                   | 100 |



## INHALTSVERZEICHNIS

|            |                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.         | EINLEITUNG                                                                                                                                                                                                                         |    |
| 1.1.       | <u>DAS PROBLEM</u>                                                                                                                                                                                                                 | 1  |
|            | Regulations- und Wirkmechanismen von Cholesterin, Progesteron, 11-Desoxycorticosteron und 17-OH-Progesteron bei Hundewelpen im unbehandelten und im mit hohen Aldosterondosen therapierten standardisierten hämorrhagischen Schock |    |
|            | Entwicklung einer zuverlässigen Bestimmungsmethode für die Plasmakonzentrationen von Progesteron, 11-Desoxycorticosteron und 17-OH-Progesteron                                                                                     |    |
| 1.2.       | <u>VORAUSSETZUNGEN</u>                                                                                                                                                                                                             | 3  |
| 1.2.1.     | DIE BIOCHEMISCH - PHYSIOLOGISCHEN ASPEKTE                                                                                                                                                                                          | 3  |
| 1.2.1.1.   | <u>Das molekulare Geschehen</u>                                                                                                                                                                                                    | 3  |
| 1.2.1.1.1. | Vom Cholesterin zum Progesteron                                                                                                                                                                                                    | 3  |
| 1.2.1.1.2. | Vom Progesteron zum DOC und 17-OH-Progesteron                                                                                                                                                                                      | 7  |
| 1.2.1.1.3. | Molekularer Wirkmechanismus des ACTH                                                                                                                                                                                               | 7  |
| 1.2.1.2.   | <u>Das metabolische Geschehen</u>                                                                                                                                                                                                  | 10 |
| 1.2.1.2.1. | Spezielle Physiologie des Cholesterins                                                                                                                                                                                             | 10 |

|              |                                                                      |    |
|--------------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.1.2.1.1. | Funktion und Regulation des adrenalen Cholesterins                   | 10 |
| 1.2.1.2.1.2. | Funktion und Regulation des zirkulierenden Cholesterins              | 10 |
| 1.2.1.2.1.3. | Die Rolle des Cholesterins in Stress- und Schockzuständen            | 11 |
| 1.2.1.2.2.   | Spezielle Physiologie des Progesterons                               | 11 |
| 1.2.1.2.2.1. | Funktion und Regulation des adrenalen Progesterons                   | 11 |
| 1.2.1.2.2.2. | Funktion und Regulation des zirkulierenden Progesterons              | 12 |
| 1.2.1.2.2.3. | Die Rolle des Progesterons in Stress- und Schockzuständen            | 13 |
| 1.2.1.2.3.   | Spezielle Physiologie des DOC                                        | 14 |
| 1.2.1.2.3.1. | Funktion und Regulation des adrenalen DOC                            | 14 |
| 1.2.1.2.3.2. | Funktion und Regulation des zirkulierenden DOC                       | 14 |
| 1.2.1.2.3.3. | Die Rolle des DOC in Stress- und Schockzuständen                     | 15 |
| 1.2.1.2.4.   | Spezielle Physiologie des 17-OH-Progesterons                         | 16 |
| 1.2.1.2.4.1. | Funktion und Regulation des adrenalen 17-OH-Progesterons             | 16 |
| 1.2.1.2.4.2. | Funktion und Regulation des zirkulierenden 17-OH-Progesterons        | 17 |
| 1.2.1.2.4.3. | Die Rolle des 17-OH-Progesterons in Stress- und Schockzuständen      | 17 |
| 1.2.2.       | DIE THERAPEUTISCHEN ASPEKTE                                          | 18 |
| 1.2.2.1.     | <u>Glucocorticoide in der Behandlung des hämorrhagischen Schocks</u> | 18 |
| 1.2.2.1.1.   | Therapieeffekte                                                      | 18 |
| 1.2.2.1.2.   | Wirkmechanismen                                                      | 19 |

|            |                                                                                                                                 |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.2.2.   | <u>Mineralocorticoide in der Behandlung des</u><br><u>hämorrhagischen Schocks</u>                                               | 20 |
| 1.2.2.2.1. | Therapieeffekte                                                                                                                 | 20 |
| 1.2.2.2.2. | Wirkmechanismen                                                                                                                 | 21 |
| 1.2.3.     | DIE METHODISCHEN ASPEKTE                                                                                                        | 22 |
| 1.2.3.1.   | <u>Flüssigkeitssäulenchromatographie mit</u><br><u>Sephadex LH 20-Gel</u>                                                       | 22 |
| 1.2.3.1.1. | Herstellung und Eigenschaften von Sephadex<br>LH 20-Gel                                                                         | 22 |
| 1.2.3.1.2. | Trennprinzipien der Flüssigkeitssäulenchro-<br>matographie mit Sephadex LH 20-Gel                                               | 23 |
| 1.2.3.2.   | <u>Aspekte radioimmunologischer Meßverfahren</u><br><u>in der Steroidanalytik</u>                                               | 24 |
| 1.2.3.2.1. | Tracersubstanzen                                                                                                                | 25 |
| 1.2.3.2.2. | Gewinnung und Eigenschaften von Anti-<br>Steroid-Antikörpern                                                                    | 25 |
| 1.2.3.2.3. | Methoden der Trennung von freiem und gebun-<br>denem Steroid                                                                    | 27 |
| 1.2.3.2.4. | Prinzipien der mathematischen Auswertung von<br>Radioimmunoassays                                                               | 27 |
| 1.2.3.3.   | <u>Statistische Qualitätskontrolle von Radio-</u><br><u>immunoassays</u>                                                        | 29 |
| 1.2.3.3.1. | Kontrolle der Spezifität                                                                                                        | 29 |
| 1.2.3.3.2. | Kontrolle der Sensitivität                                                                                                      | 30 |
| 1.2.3.3.3. | Kontrolle der Reproduzierbarkeit                                                                                                | 33 |
| 1.2.3.3.4. | Kontrolle der Richtigkeit                                                                                                       | 33 |
| 1.2.3.4.   | <u>Methodengeschichte</u>                                                                                                       | 34 |
| 1.2.3.4.1. | Geschichte der zur Bestimmung von Progesteron,<br>DOC und 17-OH-Progesteron entwickelten Metho-<br>den im Spiegel der Literatur | 34 |

|            |                                                                                  |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.3.4.2. | Die Entwicklung einer enzymatischen Methode<br>der Cholesterinbestimmung         | 37 |
| 2.         | M A T E R I A L und M E T H O D E N                                              | 39 |
| 2.1.       | <u>MATERIAL</u>                                                                  | 39 |
| 2.1.1.     | DAS UNTERSUCHUNGSMATERIAL                                                        | 39 |
| 2.1.2.     | DAS MATERIAL ZUR FLÜSSIGKEITSSÄULENCHRO-<br>MATOGRAPHIE                          | 42 |
| 2.1.3.     | DAS MATERIAL ZUM RADIOIMMUNOASSAY                                                | 46 |
| 2.1.4.     | DAS MATERIAL ZUR ENZYMATISCHEN CHOLESTERIN-<br>BESTIMMUNG                        | 47 |
| 2.2.       | <u>METHODEN</u>                                                                  | 49 |
| 2.2.1.     | DAS METHODISCHE VORGEHEN BEI ANSATZ UND<br>EXTRAKTION DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS | 49 |
| 2.2.2.     | DAS METHODISCHE VORGEHEN BEI DER<br>FLÜSSIGKEITSSÄULENCHROMATOGRAPHIE            | 50 |
| 2.2.3.     | DAS METHODISCHE VORGEHEN BEIM RADIOIMMUNO-<br>ASSAY                              | 54 |
| 2.2.4.     | DAS METHODISCHE VORGEHEN BEI DER RECHNERISCHEN<br>AUSWERTUNG DER MESSERGEBNISSE  | 58 |
| 2.2.5.     | DAS METHODISCHE VORGEHEN BEI DER ENZYMATISCHEN<br>CHOLESTERINBESTIMMUNG          | 59 |
| 3.         | E R G E B N I S S E                                                              | 63 |
| 3.1.       | <u>ERGEBNISSE DES METHODISCHEN VORGEHENS UND<br/>DER METHODENPRÜFUNG</u>         | 63 |

|          |                                                                                     |     |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.1.   | ERGEBNISSE DER ARBEITSWEISE BEI ANSATZ UND<br>EXTRAKTION DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS | 63  |
| 3.1.2.   | ERGEBNISSE DER ARBEITSWEISE BEI DER<br>FLÜSSIGKEITSSÄULENCHROMATOGRAPHIE            | 65  |
| 3.1.3.   | ERGEBNISSE DER ARBEITSWEISE BEIM<br>RADIOIMMUNOASSAY                                | 76  |
| 3.1.4.   | ERGEBNISSE DER ARBEITSWEISE BEI DER<br>ENZYMATISCHEN CHOLESTERINBESTIMMUNG          | 94  |
| 3.2.     | <u>ERGEBNISSE DER MESSUNGEN AM<br/>UNTERSUCHUNGSMATERIAL</u>                        | 100 |
| 3.2.1.   | ERGEBNISSE DER NNR-HORMONBESTIMMUNG                                                 | 101 |
| 3.2.1.1. | <u>Meßergebnisse: Progesteron</u>                                                   | 101 |
| 3.2.1.2. | <u>Meßergebnisse: DOC</u>                                                           | 102 |
| 3.2.1.3. | <u>Meßergebnisse: 17-OH-Progesteron</u>                                             | 111 |
| 3.2.2.   | ERGEBNISSE DER CHOLESTERINBESTIMMUNG                                                | 116 |
| 3.2.2.1. | <u>Meßergebnisse: Gesamtcholesterin</u>                                             | 116 |
| 3.2.2.2. | <u>Meßergebnisse: Freies und verestertes<br/>Cholesterin</u>                        | 121 |
| 3.2.2.3. | <u>Meßergebnisse: Cholesterinquotienten</u>                                         | 127 |
| 4.       | D I S K U S S I O N                                                                 | 128 |
| 4.1.     | <u>DISKUSSION DES METHODISCHEN VORGEHENS UND<br/>DER METHODENPRÜFUNG</u>            | 128 |
| 4.1.1.   | DISKUSSION DER ARBEITSWEISE BEI ANSATZ UND<br>EXTRAKTION DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS | 128 |
| 4.1.2.   | DISKUSSION DER ARBEITSWEISE BEI DER<br>FLÜSSIGKEITSSÄULENCHROMATOGRAPHIE            | 130 |
| 4.1.3.   | DISKUSSION DER ARBEITSWEISE BEIM<br>RADIOIMMUNOASSAY                                | 135 |

|        |                                                                                                 |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.4. | DISKUSSION DER ARBEITSWEISE BEI DER<br>ENZYMATISCHEN CHOLESTERINBESTIMMUNG                      | 139 |
| 4.2.   | DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER MESSUNGEN                                                         | 140 |
|        | <u>AM UNTERSUCHUNGSMATERIAL</u>                                                                 |     |
| 4.2.1. | DIE SITUATION VOR DEM HÄMORRHAGISCHEN SCHOCK                                                    | 141 |
| 4.2.2. | DAS ADRENALE GESCHEHEN IN DER OLIGÄMISCHEN<br>SCHOCKPHASE                                       | 141 |
| 4.2.3. | DAS ADRENALE GESCHEHEN IN DER NORMOVOLÄMISCHEN<br>SCHOCKPHASE UNTER KONTROLLBEDINGUNGEN         | 146 |
| 4.2.4. | DAS ADRENALE GESCHEHEN IN DER NORMOVOLÄMISCHEN<br>SCHOCKPHASE UNTER DER THERAPIE MIT ALDOSTERON | 148 |
| 5.     | Z U S A M M E N F A S S U N G                                                                   | 150 |
| 6.     | A N H A N G                                                                                     | 152 |
| 6.1.   | <u>VERZEICHNIS DER BENÜTZTEN LITERATUR</u>                                                      | 152 |
| 6.2.   | <u>VERZEICHNIS DER TABELLEN</u>                                                                 | 167 |
| 6.3.   | <u>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN</u>                                                              | 169 |

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. DAS PROBLEM

Regulations - und Wirkmechanismen von Cholesterin, Progesteron, 11-Desoxycorticosteron und 17-OH-Progesteron bei Hundewelpen im unbehandelten und im mit hohen Aldosterondosen therapierten standardisierten hämorrhagischen Schock

Entwicklung einer zuverlässigen Bestimmungsmethode für die Plasmakonzentrationen von Progesteron, 11-Desoxycorticosteron und 17-OH-Progesteron

Das Thema zu der Arbeit, die hier vorgelegt wird, ist aus den experimentellen Untersuchungen von HOLLMANN und Mitarbeitern ( 158, 159, 160, 161, 162 ) über die Besonderheiten der Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks im jungen Organismus und die therapeutische Beeinflussung des Schockgeschehens durch Aldosteron hervorgegangen. Es hat sich gezeigt, daß sich die Meßwerte sowohl fundamentaler Variabler des pulmokardiovaskulären Systems ( Atem - und Herzfrequenz ) als auch blutchemischer Untersuchungsgrößen ( Hämatokrit, pH, Plasma-Kalium und Plasma-Catecholamine ) bei Hundewelpen im hämorrhagischen Schock deutlich von den bei erwachsenen Tieren unter identischen experimentellen Bedingungen gefundenen Werten unterscheiden. Unter einer hochdosierten Aldosterontherapie ist im Schockexperiment ein Teil der pathologisch veränderten Parameter in den Normbereich zurück -  
gekehrt ; die Quote der Tiere, die das Experiment überlebt haben, ist unter den therapierten Tieren im Vergleich mit den nichtbehandelten signifikant erhöht. Die Veränderungen eines Teils der in diesem Experiment gemessenen Parameter sind in mittelbare oder unmittelbare Beziehung zu den Reaktionen der Nebennierenrinde der Versuchstiere gebracht worden, jener Funktionseinheit, der seit langem eine zentrale Rolle in der Antwort des Organismus auf Streßzustände jeglicher Genese zugeschrieben wird. Die Arbeitsgruppe SIPPELL ( 356, 357 ) hat sich daher zur Aufgabe gesetzt, durch Messung der wichtigsten Sekretions -

produkte der Nebennierenrinde im Plasma der Versuchstiere Einblick in die Reaktionsweise des Organs sowohl im unbehandelten als auch im mit hohen Mineralocorticoiddosen therapierten standardisierten hämorrhagischen Schock zu gewinnen. Zu diesem Zweck ist eine hochsensitive Meßmethode (Flüssigkeitssäulen - chromatographie und Radioimmunoassay) entwickelt worden, mit der gleichzeitig die Plasmaspiegel von Corticosteron, Aldosteron, Cortison und Cortisol bestimmt werden können.

In dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, wie sich die Forcierung der adrenalen Steroidogenese und Hormonsekretion im hämorrhagischen Schock auf die Plasmakonzentrationen biosynthetisch wichtiger Vorstufen der Corticosteroide, nämlich des veresterten und nichtveresterten Cholesterins, des Progesterons, des 11-Desoxycorticosterons und des 17-OH-Progesterons auswirkt. Darüberhinaus wird untersucht, welchen Veränderungen diese Parameter während einer hochdosierten Mineralocorticoidtherapie unterliegen. Da die adrenalen Prähormone keine oder eine nur geringe NNR-typische Hormonaktivität besitzen, bietet ihre Beobachtung zwar nicht denselben Aufschluß über die Sekretionsleistung der NNR wie die Bestimmung der Plasmaspiegel der physiologisch bedeutsamsten Corticosteroide Aldosteron und Cortisol. Dafür werden jedoch die biochemischen Reaktionen der NNR, deren beschleunigter Ablauf Voraussetzung für die gesteigerte Produktion der hochwirksamen Hormone in Stressituationen ist, nahezu komplett erfaßt.

Im methodischen Teil der Arbeit wird ein Verfahren vorgestellt, mit dem die gleichzeitige Bestimmung von Progesteron, 11-Desoxycorticosteron und 17-OH-Progesteron aus einer kleinen Plasma - probe gelingt. Dabei finden die Prinzipien der säulenchromatographischen Isolierung und Reinigung von Steroiden und der radioimmunologischen Meßtechnik Anwendung. Die Zuverlässigkeits - kriterien der Methoden werden ausführlich diskutiert.

In dem der Einleitung angegliederten Abschnitt "Voraussetzungen" werden die biochemisch-physiologischen, therapeutischen und methodischen Aspekte des Themas im Spiegel der neueren Literatur beleuchtet.

## 1.2. VORAUSSETZUNGEN

### 1.2.1. DIE BIOCHEMISCH - PHYSIOLOGISCHEN ASPEKTE

#### 1.2.1.1. Das molekulare Geschehen

##### 1.2.1.1.1. Vom Cholesterin zum Progesteron

Die Steroidogenese in der NNR nimmt ihren Ausgang vom Cholesterin. Die NNR ist befähigt Cholesterin selbst zu synthetisieren, den größten Teil ihres Cholesterinbedarfs deckt sie jedoch aus dem Serumcholesterin, das in die Zellen der NNR aufgenommen und dort in freier und veresterter Form aufbewahrt wird ( 241, 294, 387 ) . Sowohl das zur Veresterung des freien Cholesterins nötige Enzym Acyl-CoA : cholesterin-acyltransferase ( 230, 392 ) als auch die zur Hydrolyse der Cholesterinester fähige Cholesterinesterase ( 267 ) sind in der NNR nachgewiesen .

Aus der Verteilung der Enzymaktivitäten in den Kompartimenten der NNR-Zelle ( Tab.1 ) geht hervor, daß die hintereinandergeschalteten enzymatischen Teilschritte der Umsetzung von Cholesterin zu Progesteron an verschiedenen Enzymorten ablaufen : Die Reaktion Cholesterin - Pregnenolon findet in den Mitochondrien statt, die Reaktion Pregnenolon - Progesteron in den Mikrosomen des agranulären endoplasmatischen Reticulums. Für den Transport des Pregnenolons und der anderen Metaboliten in den NNR-Zellen von Enzymort zu Enzymort werden sog. Transfer-Rezeptoren verantwortlich gemacht ( 387 ) .

| Mitochondriale Enzyme                    | Mikrosomale Enzyme                             |
|------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Cholesterin-20 $\alpha$ -hydroxylase     | Delta5-3 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase |
| Cholesterin-22 $\alpha$ -hydroxylase     | Delta5-delta4-isomerase                        |
| Cholesterin-20-22-lyase                  | 17 $\alpha$ -hydroxylase                       |
| 11 $\beta$ -hydroxylase                  | 21-hydroxylase                                 |
| 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase |                                                |
| Steroid-18-hydroxylase                   |                                                |

Tab.1 : Intrazelluläre Verteilung der Enzyme der  
NNR-Steroidogenese

Die enzymatische Umsetzung von Cholesterin zu Pregnenolon gilt als zeitlimitierender Schritt in der Steroidogenese, da sie im Gegensatz zu den anschließenden Hydroxylierungsreaktionen der C 21-Steroide in der NNR langsam abläuft ( 123 ) . Die verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten sind jedoch nicht auf unterschiedliche Reaktionsmechanismen zurückzuführen, da das für die Hydroxylierungen an den Atomen C 17, C 21 und C 11 des Pregnangerüsts der Steroide postulierte einheitliche Reaktionsschema ( Abb.1 ) nach OMURA ( 275 ) auch für die Hydroxylierungen am Cholesterinmolekül gilt .

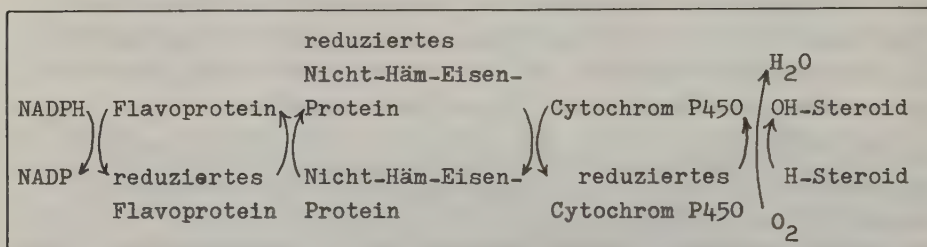


Abb.1 : Reaktionsmechanismus der Steroidhydroxylierung in der NNR

Die Steroidhydroxylierungsreaktion ist von einer sekundären Elektronentransportkette abhängig, die reduzierende Äquivalente von NADPH über ein Flavoprotein, ein Nicht-Häm-Eisen-Protein ( Adrenodoxin ) und Cytochrom P450 zum molekularen Sauerstoff transportiert ( 350, 351 ) . Das  $NADPH+H^+ / NADP^+$  - Redoxsystem der Steroidhydroxylase ist über eine Transhydrogenase mit dem  $NADH+H^+ / NAD^+$  - System der intramitochondrialen Atmungskette verbunden ( 89 ) .

Das klassische Schema der Cholesterinseitenkettenspaltung schließt zwei konsekutive Hydroxylierungen an den Atomen C 20 und C 22 des Cholesterinmoleküls durch spezifische Hydroxylasen und die anschließende Sprengung der Doppelbindung zwischen den oxygenierten C-Atomen durch eine C 20, C 22-Lyase ein. Endprodukt dieser Reaktion sind Pregnen-3 $\beta$ ol-20on ( Pregnenolon ) und Isocapronaldehyd, der anschließend entweder zu Isocapron -

säure oxidiert oder zu Isohexanol reduziert werden kann (53) . Neuere Untersuchungen machen es jedoch wahrscheinlich ( 202 ), daß ein gemeinsamer Angriff von zwei Sauerstoffmolekülen auf das Cholesterinmolekül unter Verbrauch von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  über eine 20, 22-epoxy-Zwischenstufe zum dihydroxylierten Cholesterin führt . SULIMOVICI ( 377 ) und BURSTEIN ( 54 ) betonen , daß im NNR-Gewebe sowohl mono- als auch dihydroxyliertes Cholesterin effektive Vorläufer des Pregnenolons sind .

Die mikrosomale Umwandlung des Pregnenolons in Progesteron vollzieht sich in zwei Schritten, von denen der erste die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmt . Die zu der Umsetzung erforderlichen Enzyme sind in allen endokrinen Organen vorhanden ( Abb.2 ) .

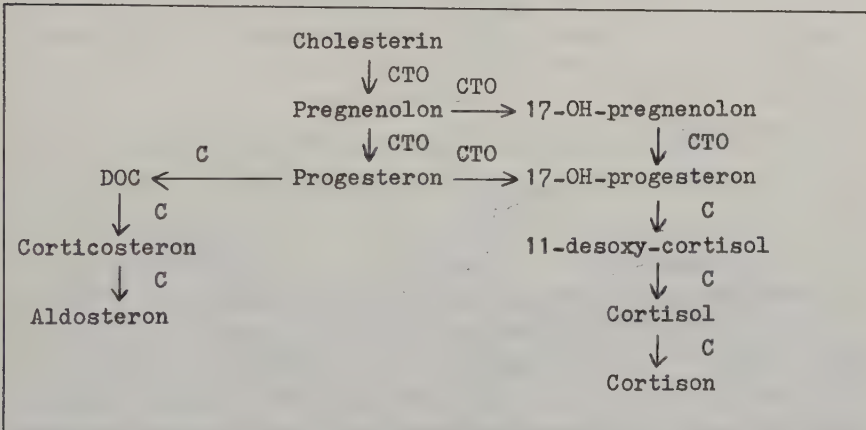


Abb.2 : Lokalisation enzymatischer Reaktionen in steroidproduzierenden Organen. Nach GRANGAUD ( 134 )  
Abkürzungen: C=Cortex(NNR) ; T=Testis ; O=Ovar

Durch die Delta5-3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase wird die Hydroxylgruppe in 3 $\beta$ -Stellung am Pregnenolonmolekül in eine Ketogruppe umgewandelt ; die Delta5-delta4-isomerase verschiebt anschließend die Doppelbindung aus der C 5 - C 6 - Stellung in die C 4 - C 5 - Stellung ( Abb.3 ) .

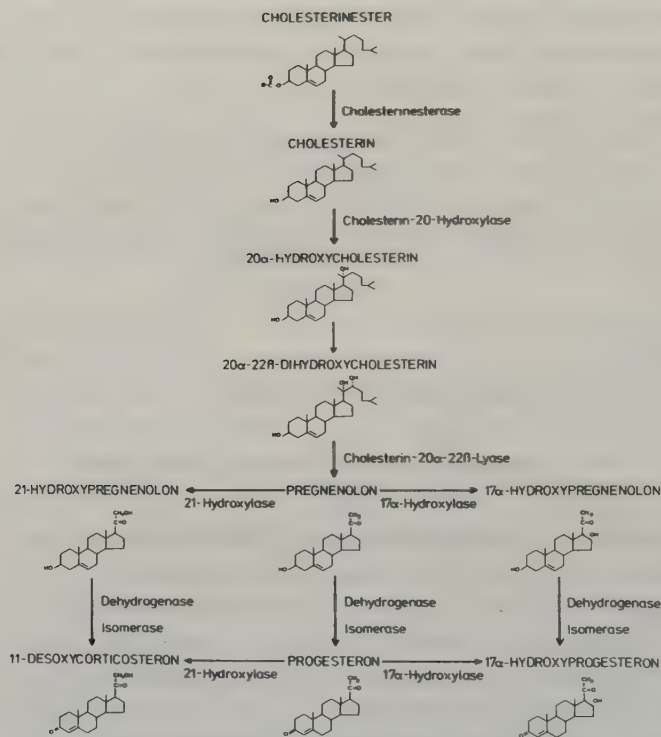


Abb.3 : Die Steroidogenese in der NNR

## 1.2.1.1.2. Vom Progesteron zum DOC und 17-OH-Progesteron

Die Enzyme zur Hydroxylierung von Progesteron in C 17 - und C 21 - Stellung sind in den Mikrosomen der NNR-Zellen lokalisiert. Durch eine Steroid-21-hydroxylase wird Progesteron in DOC, durch die Steroid-17-hydroxylase in 17-OH-Progesteron überführt. Progesteron ist jedoch entgegen früheren Ansichten kein obligatorischer Vorläufer von DOC ( und der daraus entstehenden Mineralocorticoide ) und 17-OH-Progesteron ( und der daraus entstehenden Glucocorticoide ). Eine Reihe von Untersuchern ( 30, 85, 86, 227, 229, 354, 355 ) postulieren für die Biosynthese von DOC das Alternativschema : Pregnenolon - 21 - OH - pregnenolon - DOC ; als Alternative zum klassischen Schema der Bildung von 17-OH-Progesteron wird von anderen ( 185, 223, 250, 286, 409 ) die Reaktion : Pregnenolon - 17 - OH -pregnenolon - 17-OH-Progesteron angesehen. Zumindest dem Alternativschema für die Biosynthese von 17-OH-Progesteron kommt größere physiologische Bedeutung zu ( 82 ) .

## 1.2.1.1.3. Molekularer Wirkungsmechanismus des ACTH ( Abb.4 )

Das Primärereignis im Wirkungsmechanismus des ACTH in der NNR ist die Bindung des Moleküls an Rezeptoren an der Außenseite der Zellmembranen ( 215, 279 ). Nach seinem Eindringen in die Zelle steigert das intracelluläre ACTH durch Aktivierung der Adenylatcyclase die Bildung von cyclischem AMP aus ATP ( 133, 389 ). Von der Induktion dieses als " second messenger " wohlbekannten Moleküls scheinen sämtliche Wirkungen des ACTH in der NNR abhängig zu sein, können doch durch exogenes cyclisches AMP die ACTH-typischen Veränderungen im molekularen Geschehen der NNR-Zelle imitiert werden ( 122 ). Das cyclische AMP beeinflusst nur indirekt durch die Aktivierung spezifischer Nukleinsäuren ( mRNA ) und damit der Proteinbiosynthese die Steroidogenese ( 101, 247 ). Hierbei läßt sich ein Soforteffekt, der in einer Aktivierung präformierter labiler Proteine mit nachfolgender rascher Stimulation der Steroidogenese besteht, von einem " verzögerten Effekt " mit erst nach mehreren Stunden meßbar gesteigerter Proteinsynthese, die SCRIBA ( 338 ) beschreibt, unterscheiden.

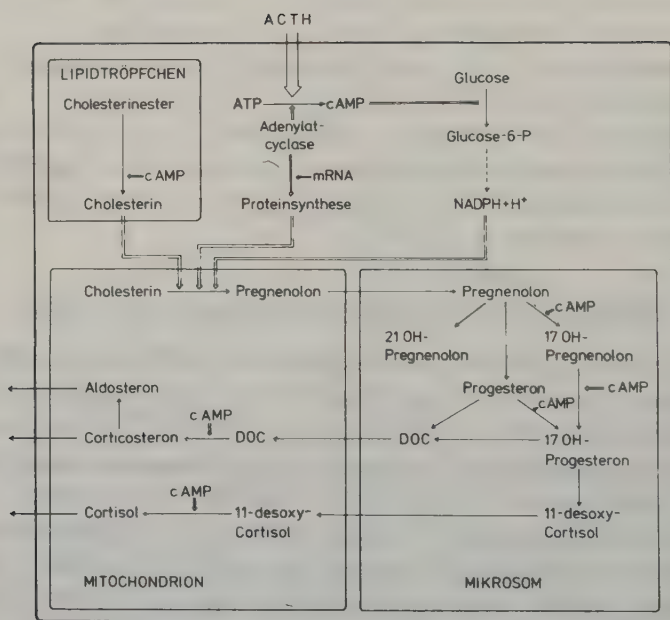


Abb.4 : Molekularer Wirkungsmechanismus des ACTH.  
Nach HART ( 146 )

Im Mittelpunkt der ACTH-Wirkungen auf die Bildung der NNR - Steroide steht sein Einfluß auf das Cholesterin. Bereits vor 20 Jahren ist vermutet worden ( 198, 370 ), daß ACTH die Corticosteroidsynthese durch sein Einwirken auf einen zwischen Acetat und Progesteron gelegenen Punkt der Reaktionskette fördert.

ACTH beeinflußt sowohl die anabolen und katabolen Schritte des Cholesterinmetabolismus in der NNR als auch das Gleichgewicht zwischen freiem und verestertem Cholesterin. Aus Beobachtungen an Rindernebennieren schließen SAVARD et al. ( 322 ), daß ACTH die Cholesterinbiosynthese auf der Stufe von Acetat und Squalen beschleunigt. Durch die cAMP-vermittelte Aktivierung der Cholesterinesterase, die vielleicht auf einem Phosphorylierungsmechanismus beruht ( 124, 353, 392 ), wird vermehrt freies Cholesterin zur Steroidbiosynthese bereitgestellt ( 75 ). Für die Stimulation der Cholesterinseitenkettenspaltung durch ACTH sind mehrere Effekte verantwortlich : Die Induktion der daran beteiligten Enzyme durch cAMP ( 149, 188 ), die ebenfalls durch cAMP vermittelte gesteigerte oxidative Phosphorylierung in der NNR mit daraus resultierender vermehrter Bereitstellung reduzierender Äquivalente und der beschleunigte Transport von Pregnenolon aus dem Mitochondrion, wo es die Cholesterinseitenkettenspaltung hemmt, an die mikrosomalen Enzymorte ( 199 ) .

Uneinheitliche Ergebnisse liegen über die Angriffspunkte des ACTH in der Steroidogenese jenseits des zeitlimitierenden Reaktionsschritts Cholesterin - Pregnenolon vor. Die mehrfach bestätigte Tatsache ( 137, 200, 201, 412 ), daß ACTH die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von DOC stimuliert, wird neuerdings von SIMPSON ( 353 ) bestritten. Unterstützt wird diese Hypothese von VECSEI et al. ( 401 ) und GRANT et al. ( 135 ), die in Rattenneben - nieren unter ACTH-Einwirkung eine gesteigerte Produktion von Corticosteron aus Progesteron beobachteten. Nach SCHWYZER ( 337 ) werden durch ACTH außerdem die Reaktionen Progesteron - 17-OH- Progesteron und 11-desoxycortisol - Cortisol beschleunigt. Dagegen berichten BERMUDEZ et al. ( 31 ), daß ACTH die Cortisol - synthese vornehmlich über eine Stimulation des Delta5-Synthesewegs ( Pregnenolon - 17-OH-Pregnenolon - 17-OH-Progesteron ) forciert.

### 1.2.1.2. Das metabolische Geschehen

#### 1.2.1.2.1. Spezielle Physiologie des Cholesterins

##### 1.2.1.2.1.1. Funktion und Regulation des adrenalen Cholesterins

Wie ANDERSON ( 14 ) aus NNR-Szintigrammen mit  $^{131}\text{J}$ -19-Jodocholesterin errechnet, beträgt der totale Cholesteringehalt der Nebennieren sowohl bei Hunden als auch beim Menschen 2 - 6 % des Feuchtgewichts des Organs. Cholesterin wird in freier und veresterter Form in Lipoidtröpfchen innerhalb des Cytosols und in einigen Mitochondrien der NNR-Zellen gespeichert ( 386 ). Freies Cholesterin ist zur Steroidsynthese rasch verfügbar, verestertes Cholesterin bildet das Substratdepot ( 148 ). Die Angaben über den Anteil des veresterten Cholesterins am Gesamtcholesterin der NNR schwanken zwischen 75 % ( 246 ) und 85-95 % ( 70, 276, 384 ) .

##### 1.2.1.2.1.2. Funktion und Regulation des zirkulierenden Cholesterins

Das Plasmacholesterin ist die größte extraadrenale Substratquelle für die NNR-Steroidogenese ( 245 ). KRUM et al. ( 204 ) und BOLTE et al. ( 43 ) nehmen an, daß die NNR-Steroide unter physiologischen Bedingungen fast ausschließlich aus Plasmacholesterin, das in die NNR transportiert wird, gebildet werden. Wie Untersuchungen an Meerschweinchen ( 410 ) und an Hunden ( 204 ) zeigen, vermag extraadrenales Cholesterin die Membranbarrieren in der NNR jedoch nur langsam zu durchdringen. Die Membranpermeation wird damit für von außen der NNR-Zelle angebotenes Cholesterin zum limitierenden Schritt in seiner Funktion für die Ankurbelung der Steroidogenese ( 148, 152, 352 ). Cholesterinester werden aus dem Plasma in geringerem Umfang in die Nebenniere aufgenommen als freies Cholesterin ( 84 ) .

Über die Geschwindigkeit, mit der sich ein Gleichgewicht von freiem und verestertem Cholesterin zwischen Plasma und Nebenniereneinstellt, liegen widersprüchliche Angaben vor : Während nach BORKOWSKI et al. ( 44 ) der Gleichgewichtszustand sehr rasch erreicht wird, stellen FIELD et al. ( 106 ) und

CHOBANIAN et al. ( 65 ) erst Tage bzw. Wochen nach Gabe einer Tracerdosis ein komplettes Gleichgewicht zwischen Serumcholesterin und Organcholesterin fest .

#### 1.2.1.2.1.3. Die Rolle des Cholesterins in Stress- und Schockzuständen

Die hepatische Cholesterinbiosyntheserate kann in gesunden ebenso wie in adrenalektomierten Tieren durch Stress verzehnfacht werden ( 64, 90, 331 ). Die Netto-Cholesterinaufnahme aus dem Plasma in die NNR wird durch den stressbedingten ACTH - Anstieg beschleunigt ( 84 ), obwohl die Membranpermeabilität für Cholesterin im Schock nicht erhöht ist ( 241 ). Nach MAHAFFEE et al. ( 236 ) wird das unter ACTH-Einfluß vermehrt aus dem Plasma in die NNR aufgenommene Cholesterin zu einem geringeren Teil als unter physiologischen Bedingungen verestert und steht damit für die Steroidogenese sofort zur Verfügung .

Den Beobachtungen von SHARMA et al. ( 346 ) und SHAEFER et al. ( 345 ), daß ACTH keine signifikante Abnahme des Gesamtcholesterins in Fasciculata-Zellen der Ratten-NNR bewirkt, stehen die Untersuchungen von SAYERS et al. ( 323, 324 ) gegenüber, aus denen sich ergibt, daß der adrenale Cholesteringehalt während maximaler ACTH-Stimulation nach drei Stunden auf 50 % des Ausgangswerts absinkt, um sich dann bei fortgesetzter ACTH-Stimulation auf diesem Wert zu stabilisieren. Das adrenale Cholesterindefizit im verlängerten Schock ist vornehmlich auf das Absinken der Gewebekonzentration des veresterten Cholesterins zurückzuführen ( 8, 22, 45, 75, 128, 174 ). In einer detaillierten Studie über den Cholesterinmetabolismus in der Ratten-NNR stellt SHIMA ( 348 ) dazu fest, daß nach ACTH-Applikation in vivo nur in den Zz. fasciculata und reticularis die Cholesterinveresterungsaktivität gesenkt und die Hydrolyseaktivität gesteigert ist, während in der Z. glomerulosa gleichartige Veränderungen fehlen.

#### 1.2.1.2.2. Spezielle Physiologie des Progesterons

##### 1.2.1.2.2.1. Funktion und Regulation des adrenalen Progesterons

Die Rolle des adrenalen Progesterons als Intermediärschubstanz in

der Corticosteroidsynthese ist nicht vollständig aufgeklärt. Nach CAMERON et al. ( 58 ) ist beim Menschen Progesteron als Vorstufe der biologisch hochwirksamen NNR-Hormone lediglich von untergeordneter Bedeutung. Bei Hunden ist der adrenale Gehalt an Pregnenolon und Progesteron gerade ausreichend, um die Summe aller binnen zwei Minuten sezernierten Steroide ersetzen zu können. ( 166 ). In den Nebennieren weiblicher Ratten ist der Progesterongehalt etwa gleich hoch oder etwas höher als in den Ovarien, gleichgültig ob sich die Tiere in Ruhe befinden oder einem Stress ausgesetzt sind ( 99 ) .

#### 1.2.1.2.2. Funktion und Regulation des zirkulierenden Progesterons

Nach LIPSETT ( 224 ) liegen mehr als 90 % des zirkulierenden Progesterons frei im Plasma vor. Der Rest ist gebunden an Albumin ( 26, 94 ), an das saure Alpha<sub>1</sub> - Glykoprotein Orosomucoid, das im Vergleich mit Albumin mehr als die doppelte Affinität zu Progesteron, aber eine 60fach geringere Plasmakonzentration besitzt ( 412 ), und an das corticosteroidbindende Globulin ( CBG = Transcortin ), um dessen Bindungsplätze es mit 17-OH-Progesteron, Corticosteron und Cortisol konkurriert. In der Ratte wird ein großer Teil des zirkulierenden Progesterons zur Produktion von Hormonen in der NNR verwendet ( 104 ). Nach RYAN et al. ( 320 ) wird Progesteron, das in den Blutstrom sezerniert worden ist, jedoch mehr durch die Leber als in endokrinen Organen metabolisiert .

Unter den extragenitalen Wirkungen des Progesterons ist im Zusammenhang mit der Untersuchung der NNR-Funktionen im Hämorrhagischen Schock besonders sein Anti-Aldosteron-Effekt hervorzuheben. Progesteron vermag durch Antagonisierung des Aldosterons eine verstärkte Natriurese herbeizuführen ( 208, 209, 210, 211, 341 ) und induziert kompensatorisch eine Erhöhung der Plasma-Renin-Aktivität ( 273, 416 ). HORROBIN ( 169 ), WEIR ( 405 ) und LLOYD et al. ( 226 ) beobachteten nach langdauernder Applikation hoher Progesterondosen eine Blutdruckerhöhung. In einer kleinen Zahl von Untersuchungen ( 83, 270 ) werden diese Progesteroneffekte allerdings vermißt. ARMSTRONG et al. ( 17 ) erzielten durch die Gabe großer Progesteronmengen

sogar eine antihypertensive Wirkung ( 17 ).

Das Serumprogesteron in der Follikelphase des Menstruationscyclus der Frau ist wahrscheinlich adrenaler Herkunft ( 304 ). In der Lutealphase des weiblichen Menstruationscyclus stehen einer verglichen mit den Verhältnissen in der Follikelphase 10 - 20fach erhöhten Plasmaprogesteronkonzentration eine verdoppelte Plasma-Renin-Aktivität ( 49, 360, 379 ), ein erhöhtes Plasma-Angiotensin II ( 378 ) und ein starker Anstieg der Aldosteronsekretionsrate ( 136 ) und des Aldosteronplasmaspiegels ( 381 ) gegenüber. Nach einer Hypothese von OELKERS et al. ( 273 ) sind diese Veränderungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System durch den progesteroninduzierten Natriumverlust bedingt. Für die Reaktion des Organismus auf einen hämorrhagischen Schock ist dieser Zusammenhang jedoch von geringer Bedeutung, da aldosteronantagonisierende Progesteronmengen nur im Ovar sezerniert werden und der Effekt sich erst mit einer Latenzzeit von ca. 24 Stunden manifestiert ( 380 ).

#### 1.2.1.2.2.3. Die Rolle des Progesterons in Stress- und Schockzuständen

Übereinstimmende Untersuchungsergebnisse liegen über das Verhalten des adrenalen Progesterons im Stress vor : Akuter Kältestress ( Dauer : 5-15 min ) verursacht in Rattennebnieren einen merklichen Anstieg der Konzentration von Pregnenolon und Progesteron ( 164 ). Nach Ätheranästhesie und Entblutung steigt bei weiblichen Ratten der adrenale Progesterongehalt um 75 % an, während der ovarielle unverändert bleibt ( 99 ). Wird der Stress jedoch verlängert, so erhöht sich die ovarielle Progesteronkonzentration, der Progesterongehalt in den Nebennieren sinkt dagegen ab. Die Untersucher führen das Progesterondefizit der NNR im schweren Stress auf einen erhöhten Umsatz des adrenalen Progesterons bei der überschießenden Produktion der hochsubstituierten C 21 - Steroide zurück .

Die Progesteronsekretion aus der Nebenniere steht unter dem Einfluß von ACTH ( 151 ). Die adrenale Progesteronsekretionsrate bei weiblichen Ratten im Stress entspricht der ovariellen Progesteronsekretionsrate der Tiere in Ruhe ( 99 ). Unter einem

milden elektrischen Stress steigt die Serumprogesteronkonzentration ovariectomierter Ratten um 139 % über den Ausgangswert, unter einem starken elektrischen Stress liegt die Progesteronkonzentration im peripheren Plasma nur um 62 % über dem Kontrollwert ( 206 ) .

Über die Möglichkeit, durch Progesterongaben die Überlebenszeit adrenalectomierter und damit einem starken Stress ausgesetzter Tiere zu verlängern, liegen widersprüchliche Untersuchungsergebnisse vor ( 125, 291, 292 ) .

#### 1.2.1.2.3. Spezielle Physiologie des DOC

##### 1.2.1.2.3.1. Funktion und Regulation des adrenalen DOC

11-Desoxycorticosteron, das erstmals 1938 aus Rinder-NNR isoliert worden ist ( 298 ), besitzt physiologische Bedeutung sowohl als Intermediärschubstanz der Steroidbiosynthese als auch als mineralotropes Sekretionsprodukt der NNR. Beim Menschen sind die Sekretionsraten von DOC und des stärksten Mineralocorticoids Aldosteron etwa gleich ( 35, 36, 37, 261 ). Bei Hunden liegt die DOC-Sekretionsrate weit über der Aldosteron-Sekretionsrate : TAYLOR et al. ( 390 ) finden bei anästhesierten Bastardhündinnen eine im Vergleich mit der Aldosteron-Sekretionsrate siebenfach höhere DOC-Sekretionsrate. DAVIS et al. ( 74 ) stellen bei Normalhunden gar eine Relation von 90 : 1 zwischen den Sekretionsraten von DOC und Aldosteron fest und schließen daraus auf eine gewisse regulatorische Funktion von DOC für die Homöostase des Elektrolythaushalts .

##### 1.2.1.2.3.2. Funktion und Regulation des zirkulierenden DOC

Der größte Teil des zirkulierenden DOC ist an Albumin gebunden und dadurch physiologisch inaktiv. Die Albuminbindung des DOC ist schwächer als die von Corticosteron und Cortisol ( 39 ). Die Bindungsaffinität von DOC zu den renalen Bindungsstellen für Mineralocorticoide ( 317 ) beträgt etwa 80 % der Bindungsaffinität des Aldosterons ( 117 ). Dennoch besitzt DOC wegen seiner starken Proteinbindung unter physiologischen Bedingungen weniger als 1 / 100 der mineralocorticoiden Aktivität des Aldosterons : Das Ausmaß der Kaliumexkretion durch DOC liegt bei

1 / 5, das der Natriumretention durch DOC bei 1 / 25 - 1 / 30 der Effektivität des Aldosterons ( 138, 218 ).

Wird DOC in pharmakologischen Dosen verabreicht, so entfaltet es als Mineralocorticoid eine hohe Aktivität, da große Mengen des Hormons in freier Form im Blut zirkulieren und die Bindungsplätze für Mineralocorticoide in den Zielorganen erreichen ( 117 ). Durch excessiv hohe DOC-Dosen und die dadurch verursachte Natriumretention läßt sich in Experimenten mit Hunden sogar eine Alkalose herbeiführen ( 295 , 314 ).

#### 1.2.1.2.3.3. Die Rolle des DOC in Stress- und Schockzuständen

Bei der Regulation der DOC-Produktion und -Sekretion in Stress- und Schockzuständen greifen mehrere Faktoren ineinander: Der stimulierende Effekt des ACTH, der Einfluß von Angiotensin II und die Interaktionen von DOC mit den Serumelektrolyten. Welche Bedeutung jedem einzelnen dieser Faktoren zukommt und in welcher Weise sich ihre Wirkungen ergänzen oder ausschließen, ist nicht endgültig geklärt.

In ihrer umfassenden Analyse der Regulation der DOC-Sekretion beim Hund berichten TAYLOR et al. ( 390 ), daß durch die Gabe von 100 mU ACTH an narkotisierte hypophysektomierte Hunde die DOC-Sekretion signifikant erhöht wird. Damit werden frühere Untersuchungen ( 102 , 227 ) über die regulatorische Funktion des ACTH bei der DOC-Produktion und -Sekretion bestätigt. TAYLOR et al. ( 390 ) können jedoch kein negatives Feedback hoher Plasma-DOC-Spiegel auf die ACTH-Ausschüttung messen. Diese Beobachtungen stehen in Widerspruch zu den Untersuchungen von SAYERS et al. ( 325 ), SAYERS (326 ) und KRAULIS et al. ( 203 ), die Anhaltspunkte für einen Rückkopplungseffekt finden.

Bei hypophysektomierten Hunden erhöht Angiotensin II die DOC - Sekretion ( 390 ). Nach einer Angiotensin II - Infusion bei nichthyphosektomierten Hunden stellt DAVIS ( 74 ) ebenfalls einen erheblichen Anstieg der DOC-Sekretion fest, der 30 Minuten nach Einleitung der Infusion erstmals meßbar wird und während der Infusion konstant bleibt. Gleichzeitig steigen die Sekretionsraten von Corticosteron und Aldosteron an. In anderen Untersuchungen ( 51, 312 ) wird eine Stimulation der Aldoste-

ronsekretion durch Angiotensin II ohne Beeinflussung des DOC - Plasmaspiegels festgestellt und damit erklärt, daß DOC als hormonell wenig wirksame Vorstufe des Aldosterons im akuten Stress rasch metabolisiert wird ( 50 ). Ebenso lehnt SPIELMAN ( 364 ) eine Angiotensin II - Wirkung auf die DOC-Sekretion ab. Über eine fast vollständige Unterdrückung der Plasma-Renin-Aktivität nach langdauernder Verabreichung hoher DOC-Dosen an nichtnarkotisierte Tiere berichten ROBB et al. ( 305 ) und PETTINGER et al. ( 285 ).

Eine gesteigerte DOC-Produktion in der NNR bei Hyperkaliämie beobachten KAPLAN ( 187 ), MÜLLER ( 249 ) und BROWN et al. ( 50 ). Die DOC-Sekretion wird jedoch durch eine Kaliuminfusion bei hypophysektomierten Tieren nicht erhöht ( 390 ).

In den Versuchen von TAYLOR et al. ( 390 ) steigert Hyponatriämie bei hypophysektomierten Hunden die DOC-Sekretion nicht. Über gegenteilige Beobachtungen berichten BLEDSOE ( 40 ) und DAVIS ( 76 ).

#### 1.2.1.2.4. Spezielle Physiologie des 17- OH-Progesterons

##### 1.2.1.2.4.1. Funktion und Regulation des adrenalen 17-OH-Progesterons

Das adrenale 17-OH-Progesteron ist biosynthetische Vorstufe sowohl für Glucocorticoide als auch für die NNR-Androgene ( 67 ). Produktion und Sekretion beider Hormongruppen stehen unter dem Einfluß des ACTH.

Nach HOLZBAUER et al. ( 165 ) ist die Konzentration von 17-OH-Progesteron in Nebennieren von Hunden, Affen und Meerschweinchen, bezogen auf das Organgewicht, etwas niedriger als die von Pregnenolon und Progesteron und beträgt 1 - 20 % der adrenalen Konzentration der hochaktiven Glucocorticoide. Wie die Untersuchungen außerdem zeigen, liegt bei Hunden die 17-OH-Progesteron-Konzentration in der NNR unter Stressbedingungen höher als bei ausgewachsenen Tieren.

#### 1.2.1.2.4.2. Funktion und Regulation des zirkulierenden 17-OH-Progesterons

Zur Regulation des 17-OH-Progesteronspiegels im Serum existieren fast ausschließlich Untersuchungen über die Verhältnisse beim Menschen. Unter dem Einfluß von LH und FSH ( 369 ) wird 17-OH-Progesteron in Ovarien ( 4, 320, 322 ) und Testes ( 232, 411 ) produziert und in den Blutstrom sezerniert ( 225, 244 ). STROTT et al. ( 374 ) schließen aus Untersuchungen über die Suppressibilität der 17-OH-Progesteron-Sekretion durch Dexamethason, daß beim Manne 90 % des Serum-17-OH-Progesterons testikulärer Herkunft sind. 5 - 20 % des Serum-17-OH-Progesterons werden erst peripher, wahrscheinlich in der Leber ( 57, 197 ) aus 17-OH-Pregnenolon gebildet ( 375 ). Als Hinweise auf einen Beitrag der NNR zum Serum-17-OH-Progesteron gelten: Die Existenz meßbarer Spiegel bei Kastraten und Kindern ( 369 ), die Existenz eines niedrigen Spiegels während der Follikelphase des Menstruationszyklus ( 373 ) und eine gewisse Korrelation zwischen den Sekretionsraten von 17-OH-Progesteron und Cortisol ( 411 ).

Im Nebennierenvenenblut des Hundes wird 17-OH-Progesteron von CARSTENSEN et al. ( 59 ) und AGASHE ( 11 ) nachgewiesen.

#### 1.2.1.2.4.3. Die Rolle des 17-OH-Progesterons in Stress- und Schockzuständen

In Versuchen an Hunden sinkt die 17-OH-Progesteron-Sekretion aus der NNR nach Hypophysektomie, während sie nach ACTH-Applikation ansteigt ( 165 ). Bei den gleichen Untersuchungen wird unter den Bedingungen eines Operationsstress eine stündliche 17-OH-Progesteron-Sekretionsrate von 5 - 10 Mikrogramm / Gramm NNR-Gewebe gemessen. Dieser Wert entspricht der gleichzeitig bestimmten Aldosteron-Sekretionsrate.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der 17-OH-Progesteronmessungen, die SCHUBERT et al. ( 334 ) im Nebennierenvenenblut von vier männlichen Rhesusaffen durchführen. Während im Nebennierenvenenblut der ruhenden Tiere 17-OH-Progesteron-Konzentrationen von 400 - 750 ng / ml gemessen werden, ist in einer Stresssituation ( die Tiere befinden sich in einem Stuhlkäfig ) kein 17-OH-Progesteron mehr nachweisbar. Die Autoren mutmaßen,

daß 17-OH-Progesteron im Stress rasch zu Hydrocortison umgewandelt und deshalb nicht sezerniert wird.

### 1.2.2. DIE THERAPEUTISCHEN ASPEKTE

Ein hämorrhagischer Schock als Zustand der akuten generalisierten Minderdurchblutung im stoffwechselaktiven Teil des Gefäßbetts eines Organismus wird als maximaler Stimulus für Hormonproduktion und -sekretion in der NNR ( 161 ) angesehen. Zahlreiche Untersucher ( 73, 103, 120, 173, 251 ) berichten übereinstimmend, daß während eines hämorrhagischen Schocks die Cortisolsekretion auf das 2 - 3fache und die Aldosteronsekretion auf das 3 - 5fache des Ausgangswertes ansteigen. In den Untersuchungen von BALLARD et al. ( 23 ) erweisen sich Herz-Lungen-Präparate von Ratten mit intakten Nebennieren als leistungsfähiger, wenn sie mit Blut von nebennierengesunden Artgenossen als mit Blut von adrenaletomierten Ratten perfundiert werden. FUKUDA ( 116 ) kann die Schocktoleranz adrenaletomierter Kaninchen durch eine dreitägige Vorbehandlung der Tiere mit physiologischen Cortisondosen ( 1 mg / kg ) beträchtlich steigern. Nach DAVSON ( 77 ) und ZWEIFACH ( 430 ) ist im Versagen der NNR - Funktion das Primärereignis im Pathomechanismus eines Schocks zu sehen.

Die Anwendung von NNR-Hormonen nimmt daher einen festen Platz in der Differentialtherapie des hämorrhagischen Schocks ein.

#### 1.2.2.1. Glucocorticoide in der Behandlung des hämorrhagischen Schocks

##### 1.2.2.1.1. Therapieeffekte

Zahlreiche experimentelle Befunde ( 66, 114, 115 ) sprechen dafür, daß die Überlebenszeit von Versuchstieren im experimentellen hämorrhagischen Schock durch die Verabreichung von Glucocorticoiden deutlich verlängert werden kann. Kein Effekt allerdings kann nachgewiesen werden, wenn die Versuchstiere einem

besonders schweren, irreversiblen hämorrhagischen Schock unterzogen werden ( 38, 171, 194, 299 ). Am besten wirksam sind Glucocorticoide in der Therapie des hämorrhagischen Schocks, wenn pharmakologische Dosen kurz vor bzw. nach Einleitung des Experiments appliziert werden ( 145, 391, 405 ). Um die volle therapeutische Wirkung zu erzielen, müssen die Glucocorticoide spätestens 15 Minuten nach Einleitung des Schocks verabreicht werden ( 52, 68 ). Der therapeutische Erfolg bleibt aus, wenn die Glucocorticoide erst im Augenblick der Reinfusion des extrakorporalen Blutvolumens appliziert werden ( 11, 141, 194, 213 ).

#### 1.2.2.1.2. Wirkmechanismen

##### Wirkungen am kardiovaskulären System

Über hämodynamische Effekte pharmakologischer Glucocorticoid-dosen in der Behandlung des hämorrhagischen Schocks gehen die Meinungen weit auseinander. Teils hat die experimentelle Prüfung postulierter Wirkprinzipien sowohl zu positiven wie zu negativen Resultaten geführt, teils lassen sich die für den Therapieerfolg verantwortlich gemachten Mechanismen miteinander nicht vereinbaren. Für eine direkte Wirkung von Glucocorticoiden auf den glatten Muskel ( 335 ) finden RONDELL ( 311 ) und BOHR ( 42 ) keinen Anhalt. Die Existenz einer durch hohe Glucocorticoiddosen hervorgerufenen Myokardstimulation mit verbesserter Herzauswurfleistung ( 256, 321 ) und gesteigertem renalem Blutfluß ( 257 ) bezweifeln LEFER ( 214 ) und SPATH ( 363 ). LILLEHEI ( 220, 221, 222 ) und DIETZMAN ( 87 ) plädieren für einen alpha-Blocker-Effekt von Glucocorticoiden im Splanchnikusbereich. Eine Vasodilatation und die Verhinderung einer ausgedehnten Hypoxie der Bauchorgane als Folge der alpha-Blockade bestätigt sich in anderen Untersuchungen ( 141, 363 ) jedoch nicht. Auch die positiven Befunde über eine Potenzierung des Pressoreffekts von Catecholaminen und anderen Vasokonstringentien durch pharmakologische Glucocorticoiddosen ( 365, 366 ) und dadurch verursachte Blutdrucksteigerung ( 69, 284 ) bleiben nicht unwidersprochen ( 322, 363 ). Dem Kininantagonismus der Glucocorticoide ( 189, 190, 191, 213 ) und der durch Glucocorticoide hervorgerufenen Hemmung der Histaminfreisetzung ( 330 ) kommt wahr-

scheinlich keine systemische Bedeutung zu.

### Stoffwechselwirkungen

Über die metabolischen Wirkungen pharmakologischer Glucocorticoiden im hämorrhagischen Schock liegen gesicherte Ergebnisse vor. Glucocorticoide verhindern die Akkumulation von Lactat und reduzieren bzw. verzögern dadurch die schocktypische Gewebsacidose ( 66, 336 ). Ein komplementärer Effekt ist die Induktion von Schlüsselenzymen des oxidativen Metabolismus ( Tryptophan-oxygenase, Tyrosin-alpha-ketoglutarat-transaminase ) ( 10, 32 ). Durch die Mobilisierung der Aminosäuren ( 28 ) wird die Gluconeogenese verstärkt ( 274 ). Damit wird das Absinken der myokardialen Glykogenkonzentration verhindert ( 78 ).

### Membranwirkungen

Von entscheidender Bedeutung für die therapeutische Wirkung von Glucocorticoiden im hämorrhagischen Schock ist ihr Stabilisierungseffekt auf die Membranen von Zellen und Zellorganellen ( 242, 248 ). Glucocorticoide dichten die Kapillarmembranen z.B. in der Lunge ab und können dadurch die Entstehung eines interstitiellen Ödems verhindern ( 153 ). Die lysosomalen Membranen in den Zellen der Organen des Splanchnikusbereichs werden durch Glucocorticoide gegen ein ischämisch gesenktes Blut-pH geschützt ( 105, 126, 127, 179 ). So wird vor allem verhindert, daß aus ischämisch geschädigten Pankreaszellen lysosomale Enzyme freigesetzt werden, die ihrerseits aus Plasmaproteinen Peptide, darunter den " myocardial depressant factor " ( MDF ) abgespalten ( 13, 180, 407 ).

#### 1.2.2.2. Mineralocorticoide in der Behandlung des hämorrhagischen Schocks

##### 1.2.2.2.1. Therapieeffekte

Über eine erfolgreiche Therapie des hämorrhagischen Schocks mit Mineralocorticoiden liegen einzelne Berichte vor. SAYERS et al. ( 327 ) und SOLOMON et al. ( 361 ) erzielten mit einer Aldosterontherapie eine den Effekten einer Glucocorticoidtherapie ver-

gleichbare Verbesserung der Schocktoleranz. In anderen Versuchen ( 52, 141, 405 ) ist die Mineralocorticoidtherapie der Behandlung mit Glucocorticoiden unterlegen. Keine Lebensverlängerung bei seinen Versuchstieren erzielt LEFER ( 214 ), wenn er hohe Aldosterondosen vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks appliziert. In Schockversuchen mit Hunden, denen Aldosteron zum Zeitpunkt der Reinfusion verabreicht wird, verbessern sich dagegen die Überlebenszeiten signifikant ( 255, 424 ). Auf eine paradoxe Dosis-Wirkungsbeziehung stößt WEIL ( 405 ) bei Schockversuchen an Ratten mit intakten Nebennieren: Tiere, die mit 0.2 mg / kg Aldosteron behandelt werden, überleben einen vierstündigen hypovolämischen Schock ( RR 35 mm Hg ) länger als solche, die die doppelte Dosis erhalten.

#### 1.2.2.2.2. Wirkmechanismen

Kardiovaskuläre Effekte einer sich über fünf Stunden erstreckenden Infusion von insgesamt 10 mg d-Aldosteron bei ausgewachsenen männlichen Bastardhunden unter Nembutalanästhesie prüft VLADUTIU ( 402 ). Der Untersucher stellt keine Veränderung von Hämatokrit und systolischem Blutdruck fest; einer sich nicht verändernden Plasma- $\text{Na}^+$ -Konzentration steht eine signifikante Senkung der Plasmakonzentration von  $\text{K}^+$  und  $\text{Mg}^{++}$  während des Experiments gegenüber: die während des Versuchs absinkende Plasma-Renin-Aktivität kehrt am Ende auf den Ausgangswert zurück.

Ein Stabilisierungseffekt an Lysosomenmembranen, wie er von Glucocorticoiden gesichert ist, läßt sich für Aldosteron nicht nachweisen ( 181, 407 ).

Sowohl Gluco- als auch Mineralocorticoide sind in der Behandlung des hämorrhagischen Schocks nur in pharmakologischen Dosen wirksam. Die Corticoidtherapie ist also keine Substitutionstherapie, wie sie erforderlich wäre, wenn ein primäres Versagen der NNR-Funktion im Sinne einer verminderten Sekretionsleistung für die Schocksymptomatik verantwortlich wäre. Die Wirkungen der pharmakologischen Corticoiddosen unterscheiden sich daher qualitativ und quantitativ von den physiologischen Effekten der NNR-Hormone.

### 1.2.3. DIE METHODISCHEN ASPEKTE

#### 1.2.3.1. Flüssigkeitssäulenchromatographie mit Sephadex

##### LH 20-Gel

Voraussetzung für die zuverlässige Analyse der zahlreichen strukturell sehr ähnlichen Steroidhormone in biologischem Untersuchungsmaterial ist ein präparatives Vorgehen bei der Auftrennung, Isolierung und Reinigung der einzelnen steroidalen Komponenten. Zu diesem Zweck sind bereits früh chromatographische Verfahren in die Steroidanalytik eingeführt worden: Papierchromatographie ( 55 ), Dünnschichtchromatographie ( 34, 72, 207, 316 ), Ionenaustauschchromatographie ( 339, 340 ), Gaschromatographie ( 100, 383 ) und Flüssigkeitssäulenchromatographie ( 24, 63 ). So entscheidende Vorteile wie hohe Wiederfindungsraten und gute Reproduzierbarkeit verschaffen vor allem den säulenchromatographischen Verfahren ein weites Anwendungsfeld in der Fraktionierung von Corticosteroiden. Als Trennmedium für konjugierte Steroide bei Säulenchromatographien bewähren sich seit langem die Sephadex-Gele ( 343 ). Durch die Bildung von Sephadexanalogen, z.B. Methyl-Sephadex ( 268 ) oder hydroxyalicyclischer Sephadexderivate ( 15, 96 ) und ihre Anwendung in der Säulenchromatographie wird die Qualität der Steroidseparation weiter gesteigert. Die bisher besten Erfolge werden bei Verwendung des hydroxypropylierten Sephadex-Analogen, das die Bezeichnung Sephadex LH 20 trägt, erzielt.

1.2.3.1.1. Herstellung und Eigenschaften von Sephadex LH 20-Gel

Basis der Sephadex-Gele ( 343 ) sind ausgewählte Dextranfraktionen, die in rohrzuckerhaltigen Lösungen von verschiedenen Stämmen von *Leuconostoc mesenteroides* hergestellt werden. Die Dextranketten werden mit Epichlorhydrin verknüpft und ordnen sich so zu einem dreidimensionalen Polysaccharidnetzwerk. Dadurch erhalten die Sephadex-Gele ihre typische Perlenform, die für die ausgezeichneten Fließ- und Trenneigenschaften bei den Chromatographien verantwortlich ist. Die Perlen des Sephadex LH 20-Gels haben einen Durchmesser von 25 - 100 Mikrometer.

Durch den hohen Gehalt an Hydroxylgruppen in den Polysaccharid-

ketten sind Sephadex-Gele hydrophil und schwellen daher in Wasser und Elektrolytlösungen. Sephadex LH 20-Gel besitzt außerdem lipophile Eigenschaften, da ein großer Teil seiner Hydroxylgruppen propyliert ist. Die Hydroxylgruppen sind durch Ätherbindungen mit den Glucoseeinheiten der Dextransketten verknüpft. Das hydroxypropylierte Sephadexderivat schwillt auch in polaren organischen Lösungsmitteln und in Mischungen aus wäßrigen und polaren Lösungsmitteln und ist darin stabil. Die Schwellvolumina für 1 g Sephadex LH 20 betragen in Dichlormethan 3.6 - 3.9 ml, in Chloroform ( 1 % Äthanol ) 3.8 - 4.1 ml und in Äthanol 3.9 - 4.3 ml. Gegenüber steroidal Substanzen verhält sich Sephadex LH 20 chemisch inert.

#### 1.2.3.1.2. Trennprinzipien der Flüssigkeitssäulenchromatographie mit Sephadex LH 20-Gel

Vier Trennprinzipien haben für die Flüssigkeitssäulenchromatographie mit Sephadex LH 20-Gel (342) Bedeutung: Gelfiltration, Adsorption, Verteilung sowie Ionenausschluß und -verzögerung.

Nach dem Prinzip der *G e l f i l t r a t i o n* werden die einzelnen Komponenten des chromatographierten Untersuchungsmaterials in einer zu ihrer Molekülgröße umgekehrten Reihenfolge eluiert, d h große Moleküle werden rascher eluiert als kleine. Die Porosität des Gels und damit das Ausmaß seiner Wirkung als Molekularsieb werden durch den Schwellungszustand entscheidend beeinflusst. Allgemein gilt eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts einer Substanz und ihrem Elutionsvolumen, jedoch ist bei Verwendung organischer Lösungsmittel eine Abweichung von der linearen Elutionsfolge möglich.

*A d s o r p t i o n s* effekte sind dafür verantwortlich, daß polare Komponenten des Untersuchungsmaterials bei Verwendung nichtpolarer Lösungsmittel im Gel stärker retiniert werden als nichtpolare Komponenten. Diese Effekte werden unter anderem auf die Knüpfung flüchtiger Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Glucoseeinheiten des Gels und den funktionellen Gruppen des Untersuchungsmaterials zurückgeführt.

*V e r t e i l u n g s* effekte entstehen, wenn das zur Elution verwendete Laufmittel sowohl unpolare als auch polare Bestand-

teile enthält. Sephadex LH 20 nimmt bevorzugt die polaren Bestandteile des Laufmittels auf; dadurch vergrößern sich Volumen und Stabilität des Gelbetts. Nicht oder wenig polare Bestandteile des gelösten Materials wandern mit der unpolaren Phase des Laufmittels und werden rascher eluiert als die polaren Bestandteile, die in die Gelpartikel eindringen. Komplizierter werden die Verhältnisse, wenn im Laufmittel mehrere polare Komponenten vorhanden sind.

Das Prinzip von Ionenausschluß und -verzögerung hat bei der Verwendung von Sephadex-Gelen in der Säulenchromatographie nur Bedeutung, wenn Laufmittel von sehr geringer Ionenstärke verwendet werden. In diesem Fall werden Anionen beschleunigt eluiert und Kationen stärker retiniert.

#### 1.2.3.2. Aspekte radioimmunologischer Meßverfahren in der Steroidanalytik

Die Bestimmung von Steroidhormonen der NNR in biologischen Flüssigkeiten und Geweben wird erstmals Anfang der fünfziger Jahre durch die Entwicklung photometrischer Nachweisverfahren ( 156, 259 ) möglich. In der Folge werden Fluorometrie und Doppelisotopenderivatverdünnungsmethode in die Steroidanalytik eingeführt: Die zuerst von SWEAT ( 382 ) beschriebene hochintensive Fluoreszenz 11-oxygenierter Corticosteroide mit konzentrierter Schwefelsäure erlaubt die gleichzeitige Bestimmung von Corticosteron und Cortisol. Mit der Doppelisotopenderivatverdünnungsmethode nach dem Prinzip von KESTON et al. ( 192 ), die AVIVI et al. ( 19 ) unter Verwendung von markiertem Essigsäureanhydrid erstmals zur Steroidanalyse heranziehen, werden eine Reihe weiterer Hormone bestimmbar. Gaschromatographische Meßverfahren ( 100, 383, 396, 397 ), um die die Steroidanalytik zu Beginn der sechziger Jahre bereichert wird, machen in Verbindung mit hochsensiblen Detektionsmethoden die Messung von Steroidhormonkonzentrationen im ng-Bereich mit absoluter Spezifität möglich. Voraussetzung für eine gaschromatographische Bestimmung sind intensive Vorreinigung des steroidhaltigen Materials und Bildung hitzestabiler Derivate ( 121, 231 ). In der zweiten Hälfte der sechziger Jahre werden zwei sättigungsanalytische Verfahren für Steroidbestim-

mungen nutzbar gemacht: Proteinbindungsmethode und Radioimmunoassay ( 252 ). Durch die Verwendung radioaktiv markierter Substanzen kann dabei der Sättigungsgrad einer Bindungsreaktion zwischen der zu messenden Substanz und einem spezifischen Bindungsprotein erfaßt und aus dem Meßwert die gesuchte Konzentration ermittelt werden. Im Proteinbindungsassay können physiologische Bindungsproteine ( CBG, SHBG ) aus Human- oder tierischem Plasma verwendet werden; für die radioimmunologischen Steroidmessungen werden spezifische Antikörper in verschiedenen Tierespezies ( v.a. Kaninchen ) hergestellt.

Radioimmunologische Steroidbestimmungen sind prinzipiell den weit verbreiteten Radioimmunoassays für andere Nicht-Eiweiß-Hormone ( z.B. der Schilddrüse ) und für Peptidhormone ( z.B. Insulin und Gonadotropine ) ähnlich. In der praktischen Durchführung bestehen jedoch Unterschiede.

#### 1.2.3.2.1. Tracersubstanzen

Als Tracersubstanzen in Steroid-Radioimmunoassays werden fast ausschließlich Beta-Strahler verwendet. Die Tracersteroidoide sind gewöhnlich in ein, zwei oder vier Positionen an den Ringen A und B des Sterangerüsts markiert. Die Markierung der Kohlenstoffatome mit  $^{14}\text{C}$  (Halbwertszeit: 5568 Jahre ) ist zugunsten der Markierung der Wasserstoffatome mit  $^3\text{H}$  ( Halbwertszeit: 12,36 Jahre ) verlassen worden. Erst durch die Verwendung tritierter Steroide, die eine um drei Größenordnungen höhere spezifische Aktivität als  $^{14}\text{C}$ -markierte Steroide besitzen, sind RIA-Standardkurven im ng- und pg- Bereich möglich geworden. Im Bindungsverhalten  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -markierter Steroide zu Bindungsproteinen bzw. Antikörpern bestehen allerdings keine Unterschiede ( 400 ).

#### 1.2.3.2.2. Gewinnung und Eigenschaften von Anti-Steroid-Antikörpern

Substanzen mit einem  $\text{MG} < 1000$  sind nicht per se immunogen. Das kleinste Molekül, das den Charakter eines Vollantigens besitzt und in Tierspezies die Produktion spezifischer Antikörper stimuliert, ist das Vasopressinmolekül (  $\text{MG}: 1080$  ). Steroidmoleküle (  $\text{MG}: 200 - 300$  ) sind Haptene und gewinnen Antigencharakter erst dadurch, daß sie mit einem Trägermolekül ( Carrierpro-

tein ) konjugiert werden ( 129, 399 ). Als Carrierproteine werden vorwiegend Albumine ( MG: 70 000 ) und synthetische Polypeptide verwendet. Carriermoleküle, die wie Albumin oder Thyroglobulin selbst Antigencharakter besitzen, sind zur Koppelung mit Steroiden besser geeignet als solche, die nicht von sich aus immunogen sind, wie die Hochpolymere von Aminosäuren ( 368 ). Das Trägerprotein wird, meist über einen " chemischen Arm " ( z.B. Hemisuccinat ), an die Hydroxyl- und Ketogruppen der Steroide gekoppelt ( 97, 219 ). Nur wenn Steroidkonjugate, deren molares Steroid : Protein-Verhältnis größer als 20 : 1 ist, zur Immunisierung verwendet werden, besteht Aussicht, daß die Versuchstiere gegen das Steroidantigen einen spezifischen Antikörper produzieren ( 264 ).

Zur Erstimmunisierung werden den Versuchstieren wenige mg des Steroid-Protein-Konjugats, emulgiert in Freund's Adjuvans, durch zahlreiche multilokuläre, meist subcutane Injektionen appliziert. Einige Wochen später erhalten die Tiere eine Boosterinjektion. Sechs Wochen nach der Erstimmunisierung kann das Plasma der Versuchstiere eine Antikörperpopulation enthalten, die in radioimmunologischen Meßverfahren eingesetzt werden kann. Die weitaus am häufigsten zur Produktion von Anti-Steroid-Antikörpern verwendete Tierspezies ist das Kaninchen; weibliche Tiere sind im allgemeinen mit größerem Erfolg immunisierbar als männliche ( 48 ).

Die bei Radioimmunoassays als Antikörper verwendeten Immunglobuline ( 278 ) sind nicht absolut spezifisch für das Antigen, gegen das sie gebildet werden, denn der immundominante Ort der Steroidhormone wird wahrscheinlich durch das allen Steroiden gemeinsame tetracyclische Kohlenwasserstoffskelet repräsentiert ( 175 ). Für die Spezifität der Immunantwort sind Anzahl und Orientierung der funktionellen Gruppen am Sterangerüst verantwortlich. Je weiter die Konjugationsstelle mit dem Trägerprotein von den charakteristischen funktionellen Gruppen des Steroidmoleküls entfernt ist, desto weniger sind die " antigenen Erkennungsgruppen " des Haptens durch den Carrier maskiert und desto spezifischere Antikörper werden gebildet. ISMAIL ( 175 ) weist jedoch einschränkend darauf hin, daß, da die Immunantwort eine systemische Reaktion ist, eine Biotransformation und Interkonversion von Steroidmolekülen dem Kontakt mit den antikörperpro-

duzierenden Lymphocyten vorausgehen kann und dadurch die mögliche Spezifität einer Immunantwort von vorneherein reduziert ist. Durch Reinigungsschritte (168) und chromatographische Verfahren (139, 235, 428) können Antikörperpopulationen mit niedriger Assoziationskonstante aus dem antikörperhaltigen Serum weitgehend entfernt und dadurch die Qualität des Antikörpers verbessert werden. So erzielten DI PIETRO et al. (88) durch Isolierung einer spezifischen Antikörperpopulation aus dem unbehandelten Antiserum mittels Ionenaustauschchromatographie bei einem Pregnenolon-RIA eine gegenüber Versuchen mit dem "Rohserum" 20-fach verbesserte Sensitivität ihrer Messungen.

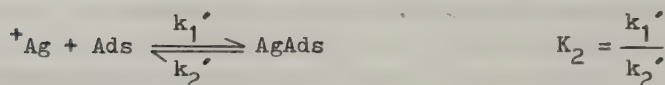
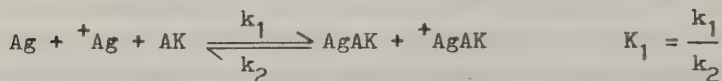
#### 1.2.3.2.3. Methoden der Trennung von freiem und gebundenem Steroid-Antigen

Nach NIESCHLAG & WICKINGS (262) wird bei etwa 60 - 70 % der Steroid-RIA das nach der Antigen-Antikörper-Inkubation ungebundene Steroid mittels einer Dextran-Kohle-Suspension (154, 313) aus dem Probenansatz entfernt. Dextran bildet in der Suspension eine Matrix, die nur die Partikel mit niedrigem MG, d.h. im Falle des Steroid-RIA, das freie Steroid an die Kohle adsorbieren läßt. Die Antigen-Antikörper-Komplexe bleiben dagegen in Lösung (269). Bei 20 % der Steroid-Ria werden die Steroid-Antikörper-Komplexe mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung präzipitiert. Andere Methoden zur Trennung von freiem und gebundenem Antigen wie die "Solid-Phase"-Technik (147, 182) und die Doppelantikörpertechnik (240, 243) haben dagegen eine vergleichsweise geringe Bedeutung.

#### 1.2.3.2.4. Prinzipien der mathematischen Auswertung von Radioimmunoassays

Die rein graphische Auswertung radioimmunologischer Meßdaten ist mit großen Fehlern behaftet (212). Graphische Darstellungen werden meist zur Veranschaulichung der Bindungsverhältnisse zwischen dem Antikörper und den wechselnden Mengen des stummen Antigens verwendet. Eine mathematisch zuverlässige Auswertung radioimmunologischer Meßdaten hat entweder die Linearisierung oder die genauere mathematische Analyse der Standardkurven zur Voraussetzung. Die meisten Linearisierungsverfahren gehen von der Annahme

aus, daß die Reaktionen zwischen Antigen und Antikörper bzw. Adsorbens reversible Reaktionen 1. Ordnung sind, für die die folgenden Gleichungen gelten:



|                                   |                            |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Ag                                | = Antigen                  |
| <sup>+</sup> Ag                   | = markiertes Antigen       |
| AK                                | = Antikörper               |
| Ads                               | = Adsorbens                |
| k <sub>1</sub> , k <sub>1</sub> ' | = Assoziationskonstanten   |
| k <sub>2</sub> , k <sub>2</sub> ' | = Dissoziationskonstanten  |
| K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub>   | = Gleichgewichtskonstanten |

Eine ausführliche Zusammenstellung der bisher zur Linearisierung oder Kurvenanalyse von RIA-Standardkurven verwendeten mathematischen Methoden bieten VOGT et al. (403). Die Autoren unterscheiden zwischen einer Gruppe heuristischer Verfahren und einer anderen Gruppe von Verfahren, die auf theoretischen Überlegungen basieren oder theoretisch begründet werden können. In beiden Gruppen dominieren lineare und nichtlineare Regressionsverfahren. Die weiteste Verwendung findet die von RODBARD et al. (307) angegebene  $\log y / \log x$  - Transformation, mit der fast im gesamten Bereich einer RIA-Standardkurve Linearisierung erzielt werden kann.

### 1.2.3.3. Statistische Qualitätskontrolle von Radioimmunoassays

Die Entscheidung über die Eignung eines radioimmunologischen Verfahrens zu Messungen an einem größeren Untersuchungsmaterial gründet sich auf die Beurteilung von Kriterien der Praktikabilität und der Zuverlässigkeit der Methode. An Radioimmunoassays werden die gleichen Zuverlässigkeitskriterien wie bei anderen Meßverfahren geprüft, nämlich die Spezifität, die Sensitivität, die Reproduzierbarkeit und die Richtigkeit der Methode. Die statistische Qualitätskontrolle gliedert sich in Untersuchungen, die lediglich einmal vor dem routinemäßigen Einsatz der Meßmethode durchzuführen sind, und solche, die regelmäßig wiederholt werden.

#### 1.2.3.3.1. Kontrolle der Spezifität

Die Spezifität eines Radioimmunoassays ist Ausdruck der Ausschließlichkeit, mit der Antigen und Antikörper reagieren ( 205 ), sie ist also zur Spezifität der Bindungspartner proportional. Die Spezifität des Antigens, d.h. der zu bestimmenden Substanz ist von ihrer Konzentration im Untersuchungsmaterial und dem Grad der Isolierung und Reinigung vor der radioimmunologischen Messung abhängig. Die Spezifität des Antikörpers wird durch das Ausmaß der Bindungsreaktionen bestimmt, die eine Antikörperverdünnung mit Substanzen eingeht, die, sei es wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit oder wegen ihrer bekannten oder erwarteten hohen Konzentration im Untersuchungsmaterial ( 263 ), mit der zu bestimmenden Substanz im Radioimmunoassay interferieren können. Zur Testung der Kreuzreaktivität des Antikörpers werden - unter den standardisierten Versuchsbedingungen - gleiche Aliquots einer Antikörperverdünnung mit verschiedenen Mengen des Antigens und potentiell kreuzreagierender Substanzen inkubiert. Als Tracersubstanz werden dabei radioaktiv markierte Moleküle desjenigen Antigens eingesetzt, zu dessen Messung der Antikörper verwendet werden soll. Die aus diesen Versuchen gewonnenen Meßergebnisse lassen sich graphisch darstellen und rechnerisch auswerten. Zur graphischen Darstellung werden die Sättigungskurven der Bindungsreaktionen zwischen dem Antikörper und dem Antikörper und dem Antigen bzw. den kreuzreagierenden Substanzen in das gleiche Achsenkreuz ( siehe Abb. 21, S. 86 ) eingetragen. Der

horizontale Abstand der Sättigungskurven ist ein Maß für die Kreuzreaktivität des Antikörpers gegenüber den getesteten Substanzen. Um die Meßwerte rechnerisch auswerten zu können, werden jeweils die Mengen von Antigen und Kreuzantigenen zueinander in Beziehung gesetzt, die 50 % des antikörpergebundenen markierten Antigens von den Bindungsstellen verdrängen ( 1 ). Die prozentuale Kreuzreaktion wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Kreuzreaktion \%} = \frac{\text{Menge des Antigens, das 50 \% \text{ der Tracersubstanz aus der AK-Bindung verdrängt}}{\text{Menge des Kreuzantigens, das 50 \% \text{ der Tracersubstanz aus der AK-Bindung verdrängt}}} \times 100 \%$$

#### 1.2.3.3.2. Kontrolle der Sensitivität

Die Sensitivität einer Meßmethode ist Maß für das Auflösungsvermögen der nach der Methode durchgeführten Analysen. Von Radioimmunoassays wird gewöhnlich nur die untere Grenze der Sensitivität, d.h. die kleinste von Null verschiedene analysierbare Menge der durch den RIA zu bestimmenden Substanz, angegeben. Dagegen fordern REEVES et al. ( 296 ), die Empfindlichkeit von RIA nicht nur im unteren, sondern über den gesamten von der Methode erfaßten Meßbereich zu ermitteln. Bei radioimmunologischen Meßmethoden wird zwischen der Sensitivität der Standardkurve und der Sensitivität des Gesamtassays unterschieden. Die Sensitivität der Standardkurve ist abhängig von der spezifischen Aktivität der verwendeten Tracersubstanz und der Zählausbeute der Meßgeräte ( 359 ), von der im RIA eingesetzten Menge des markierten Antigens ( Sättigung der Antikörper-Bindungsstellen! ), von Titer und Affinität des Antikörpers, vom Volumen des Inkubationsmediums ( die Affinitätskonstante hat die Einheit 1 / mol ) und von der Reproduzierbarkeit der Methode. Die Sensitivität des Gesamtassays ist außer von den Faktoren, die auf die Sensitivität der Standardkurve Einfluß nehmen, von der eingesetzten Menge des

Untersuchungsmaterials, von den Wiederfindungsraten bei Reinigungsschritten sowie von Teilungsfaktoren und vom Methodenblank abhängig. Die Untergrenze der Sensitivität der Standardkurve wird in Form der doppelten Standardabweichung SD des Nullwerts ( 95 %-Vertrauensbereich ) angegeben, die Untergrenze der Sensitivität des Gesamtassays wird aus der Formel  $2 \times SD / W \times F$  ( SD = Standardabweichung, W = Wiederfindung, F = Teilungsfraktion ) errechnet.

#### Bestimmung des Antikörper-Titers

Der Titer ( Einheit: Mol / l ) eines Antikörpers ist als Produkt aus der Affinitätskonstante  $K_a$  und der molaren Konzentration der freien Bindungsstellen des Antikörpers definiert ( 5 ). Diese Definition gilt nur, wenn die molare Konzentration des markierten Liganden im Bereich von  $10^{-10}$  bis  $10^{-11}$  Mol / l liegt, geht man von den üblichen Affinitätskonstanten der für RIA verwendeten Antikörper aus ( 6 ). In der Praxis versteht man unter dem Titer des Antikörpers jene Verdünnung des Antiserums, von der ein bestimmtes konstantes Volumen unter standardisierten Versuchsbedingungen ca. 50 % der im RIA eingesetzten Tracermenge bindet ( 7 ).

#### Bestimmung der Assoziationskonstante

Die Affinität des in einem RIA verwendeten Antikörpers ist verantwortlich für die Sensitivität der Messungen. Zur Bestimmung der Assoziationskonstante  $K_a$  stehen zwei graphische Methoden zur Auswahl: SCATCHARD-Plot ( 33, 308, 328 ) und MICHAELIS-MENTEN-Diagramm ( 272 ). Beim SCATCHARD-Plot werden in einem Achsenkreuz die molaren Konzentrationen des von einem konstanten Aliquot der Antikörper-Verdünnung gebundenen Tracers ( x-Achse ) gegen den Quotienten aus gebundenem und freiem Tracer ( y-Achse ) aufgetragen. Der steile Kurventeil veranschaulicht die Bindungseigenschaften der Antikörper-Population mit hoher Affinität, der flache Kurventeil die der Population mit geringer Affinität zum Antigen. Zur graphischen Auswertung werden die Schnittpunkte der geradlinig verlängerten beiden Kurvenabschnitte mit der x- bzw. y-Achse markiert; aus dem Quotienten

Abschnitt auf der y-Achse

Abschnitt auf der x-Achse

wird die Assoziationskonstante des Antikörpers errechnet.

Versuche, in denen konstante Aliquots der Antikörperverdünnung mit wachsenden Tracermengen inkubiert werden, liefern auch die Rohdaten für das MICHAELIS-MENTEN-Diagramm. Am Punkt der halbmaximalen Antikörpersättigung ist der Kehrwert der freien Antigenkonzentration gleich der Assoziationskonstanten.

$$K_a = \frac{1}{\text{Antigen total} - \text{Antigen gebunden}}$$

Die aus dem MICHAELIS-MENTEN-Diagramm ermittelte Assoziationskonstante charakterisiert die Bindungseigenschaften des Durchschnitts der in einem Antiserum enthaltenen heterogenen Antikörper-Populationen.

### Blanks

Blanks sind einer der ernstesten Störfaktoren radioimmunologischer Messungen ( 266 ), das Ausmaß des durch Blanks verursachten Meßfehlers bedarf dauernder Kontrolle. Blanks sind die Ergebnisse unerwünschter Einflüsse auf die Antigen-Antikörper-Reaktion im Radioimmunoassay. Positive Blanks täuschen höhere, negative Blanks geringere als die tatsächlich im Probenansatz vorhandenen Antigenkonzentrationen vor. Die häufigsten Ursachen positiver und negativer Blanks sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

| Ursachen positiver Blanks                                                                    | Ursachen negativer Blanks                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rückstände von Extraktionsmitteln und von bei Reinigungsschritten verwendeten Lösungsmitteln | Reste des Tracermaterials, das zur Berechnung der Wiederfindung bei Reinigungsschritten in den Probenansatz <u>einggebracht wird</u> |
| <u>Verunreinigte Glasware</u>                                                                | Schadhafte Tracersubstanzen ( "incubation damage" )                                                                                  |
| <u>Verunreinigung bei Trocknungsvorgängen</u>                                                | Interferenzsubstanzen (Proteine, Lipide), die mit dem Liganden um Bindungsplätze am Adsorbens konkurrieren                           |
| <u>Unspezifische RIA-Interferenzsubstanzen</u>                                               | <u>Unvollständige Trennung von freiem und gebundenem Ag</u>                                                                          |
| <u>Spezifische RIA-Interferenzsubstanzen ( Konkurrenten um Antikörper-Bindungsplätze )</u>   |                                                                                                                                      |
| <u>Nicht intakter Antikörper</u>                                                             |                                                                                                                                      |

Tab. 2 : Ursachen von RIA-Blanks ( 6, 217, 262, 266, 287 )

Aud der Aufstellung geht hervor, daß unter den RIA-Blanks solche, die beim methodischen Vorgehen während der Probenanalyse entstehen, zu unterscheiden sind von "Plasma-Blanks", die auf spezifischen und unspezifischen Interferenzwirkungen des biologischen Materials beruhen, in dem die zu analysierende Substanz enthalten ist. Zur Bestimmung des "methodischen" Blanks werden Ansätze mit destilliertem Wasser, zur Messung des "Plasma-Blanks" Ansätze von Plasma, das frei ist von der zu bestimmenden Substanz, verwendet. Die Fehler, die durch den methodischen Blank entstehen, werden durch geeignete Maßnahmen ( sorgfältige Reinigung der verwendeten Materialien, Zusatz von Lösungsmittelaliquots zu den Eichansätzen ) größtenteils ausgeschaltet; Fehler, die aus dem variablen "Plasma-Blank" resultieren, werden bei der Diskussion der Meßergebnisse berücksichtigt.

#### 1.2.3.3.3. Kontrolle der Reproduzierbarkeit

Je weniger die Ergebnisse von gleichzeitig oder zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Mehrfachanalysen der gleichen Probe vom Mittelwert der Messungen abweichen, desto besser ist die Reproduzierbarkeit der Methode. Die laufende Kontrolle der Reproduzierbarkeit der radioimmunologischen Messungen stützt sich auf regelmäßige Analysen des gleichen Untersuchungsmaterials ( "Plasma-Pool" ). Die statistische Prüfung ( Mittelwert, Standardabweichung, Variationskoeffizient ) der innerhalb des gleichen Analysengangs am selben Untersuchungsmaterial ermittelten Meßwerte läßt exakte Aussagen über die INTRA-Assay-Reproduzierbarkeit zu, die Prüfung der in verschiedenen Analysengängen am selben Untersuchungsmaterial ermittelten Resultate gestattet die Beurteilung der INTER-Assay-Reproduzierbarkeit. Zusätzliche Berechnungen empfiehlt RODBARD ( 309 ).

#### 1.2.3.3.4. Kontrolle der Richtigkeit

Ein Meßverfahren ist richtig, wenn die damit gewonnenen Ergebnisse mit den "wahren Werten" übereinstimmen. Grundsätzlich läßt sich die Richtigkeit einer Meßmethode nur durch Vergleichsmessungen mit einem oder mehreren Verfahren am selben Untersuchungsmaterial prüfen. Als Ersatz für Vergleichsmessungen mit anderen

Methoden dienen bei der Richtigkeitskontrolle der radioimmunologischen Messungen vorwiegend zwei Verfahren: Parallelitätstest ( Verdünnungstest ) und Wiederfindungstest. Beim Parallelitätstest werden, zumeist in einer arithmetischen oder geometrischen Reihe angeordnete, wachsende Aliquots des gleichen Analysenmaterials untersucht. Zum Wiederfindungstest setzt man verschiedene definierte Mengen der zu analysierenden Substanz zur Messung ein. Durch graphische Darstellung und statistische Auswertung ( Korrelation, Regression ) der Meßergebnisse wird die lineare Abhängigkeit, im ersten Test, zwischen den eingesetzten Aliquots und den ermittelten Mengen bzw. Konzentrationen, im zweiten Test, zwischen den eingesetzten ( "added" ) und den wiedergefundenen ( "found" ) Mengen der zu analysierenden Substanz geprüft.

#### 1.2.3.4. - Methodengeschichte

##### 1.2.3.4.1. Geschichte der zur Bestimmung von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron entwickelten Methoden im Spiegel der Literatur

Die meisten der unter 1.2.3.2. aufgeführten Methoden der Steroidanalytik sind für die Bestimmung von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron in biologischem Untersuchungsmaterial angewendet worden ( Tab. 3 ).

| M E T H O D E                                            | P R O G E S T E R O N    | D O C                 | 1 7 - O H - P R O G E S T E R O N |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| UV-ABSORPTION                                            | ZANDER (423) 1954        |                       | UMBERGER (394) 1955               |
| SPEKTROPHOTOMETRIE                                       | HINSBERG (156) 1956      |                       | ROBERTS (306) 1962                |
| (100-2000 ng)                                            | SHORT (349) 1958         |                       | CAVINA (62) 1966                  |
|                                                          | SOMMERVILLE (362) 1963   |                       |                                   |
|                                                          | WATSON (404) 1967        |                       |                                   |
| FLUOROMETRIE                                             | HEAP (150) 1964          |                       |                                   |
| (5-50 ng)                                                | GRAEF (131) 1970         |                       |                                   |
|                                                          | EGG (93) 1973            |                       |                                   |
| DOPPELISOTOPEN<br>DERIVAT<br>VERDÜNNUNG<br>(0.05-5.0 ng) | WOOLEVER (419) 1963      | ARNOLD (18) 1971      | ODDIE (271) 1972                  |
|                                                          | RIONDEL (304) 1965       | ODDIE (271) 1972      |                                   |
|                                                          | WIEST (414) 1967         | SETH (344) 1972       |                                   |
| GASCHROMATOGRAPHIE                                       | VAN DER MOLEN (398) 1965 | RAPP (289) 1966       | RUNNEBAUM (318) 1965              |
| (0.05-5.0 ng)                                            | WTMAN (420) 1968         | EXLEY (98) 1967       | MARESCOTTI (238) 1967             |
|                                                          | SEMESH (347) 1971        | WILSON (415) 1971     | KNORR (195) 1968                  |
|                                                          | DEHENNIN (79) 1974       | ZUCCARELLO (429) 1974 | HOLZBAUER (166) 1968              |
|                                                          |                          | MASON (239) 1975      |                                   |

| M E T H O D E                                         | P R O G E S T E R O N                                                                                                                             | D O C                                                                       | 1 7 - O H - P R O G E S T E R O N                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PROTEIN<br>BINDUNGS<br>METHODE (CPB)<br>(0.2-10.0 ng) | NEILL (258) 1967<br>JOHANNSON (183) 1969<br>LURIE (233) 1970<br>REEVES (297) 1970<br>DEMETRIOU (80) 1971<br>HORTH (170) 1972<br>BALDWIN (21) 1974 | BROWN (50) 1971<br>TAN (388) 1975                                           | STROTT (372) 1968<br>HOLMDAHL (163) 1971<br>STONE (371) 1971<br>STEWART-BENTLEY (369) 1971<br>LUIST (232) 1973                                               |
| RADIO<br>IMMUNO<br>ASSAY (RIA)<br>(0.005-0.1 ng)      | ABRAHAM (2) 1971<br>FURUYAMA (118) 1971<br>HASAN (147) 1971<br>KUTAS (205) 1972<br>EFFER (91) 1973<br>PANG (277) 1974                             | ARNOLD (18) 1971<br>JAMES (178) 1972<br>CASTRO (61) 1973<br>WISE (417) 1975 | ABRAHAM (3) 1971<br>YOUSSEFNEJADIAN (421) 1972<br>WEST (411) 1973<br>POWELL (288) 1973<br>VON SCHNAKENBURG (333) 1974<br>JÄNNE (177) 1975<br>HAMT (144) 1975 |

Tab. 3 : Literaturauswahl zu den gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron

Die Angabe (in Klammern) hinter den Bestimmungsmethoden bezieht sich auf die jeweiligen Sensitivitätsgrenzen.

#### 1.2.3.4.2. Die Entwicklung einer enzymatischen Methode der Cholesterinbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins im Plasma sind eine Reihe kolorimetrischer Methoden entwickelt worden, von denen die Verfahren nach LIEBERMANN-BURCHARD ( Bildung eines grünen Farbstoffs mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure ) und ZAK ( Bildung eines roten Farbstoffs mit Eisen-III-Chlorid in konzentrierter Schwefelsäure ) im klinisch-chemischen Labor die gebräuchlichsten sind. Bei beiden Verfahren werden jedoch neben Cholesterin auch Plasmaproteine, Hämoglobin und Bilirubin erfaßt, so daß man nur dann mit zuverlässigen Meßergebnissen rechnen kann, wenn der Farbreaktion eine Eiweißfällung- oder dispersion vorausgeht. Die Praktikabilität der Methoden ist durch die Verwendung von stark ätzenden Reagentien und die Temperaturempfindlichkeit der Reaktion eingeschränkt .

Von diesen Verfahrensmängeln weitgehend frei ist die enzymatische Methode der Cholesterinbestimmung, die vor wenigen Jahren entwickelt worden ist und rasch ins klinisch-chemische wie ins wissenschaftliche Labor Eingang gefunden hat ( 12, 107, 301, 302, 303, 310 ). Messungen mit dieser Methode werden weder von erhöhten Triglyceridkonzentrationen noch von Serumproteinen oder Pharmaka ( Antikoagulantien ) verfälscht; die Reagentien sind ungefährlich.

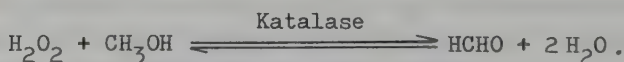
Die Entwicklung einer enzymatischen Methode der Cholesterinbestimmung fußt auf der erstmals 1944 von TURFITT ( 393 ) mitgeteilten und später von SCHATZ et al. ( 329 ) und STADTMAN et al. ( 367 ) bestätigten Beobachtung, daß es mikrobielle Enzyme gibt, die Cholesterin oxidieren können. Eine genaue Charakterisierung des Enzyms wird jedoch erst möglich, als man es aus *Nocardia* sp. isolieren und hochgereinigt darstellen kann. Da elektronenoptische Untersuchungen ergeben, daß das Enzym in den Zellwänden lokalisiert ist, verwendet man zur Extraktion Detergentien; mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie wird störende Katalase entfernt. Unter den physikalischen Eigenschaften des Enzyms stechen die lange Haltbarkeit (bei 4°C sechs Monate) und die Hitzestabilität hervor.

Nach der Reaktionsgleichung :



wird Cholesterin unter der Einwirkung der Cholesterinoxidase ( ChOd ) und unter Verwendung molekularen Sauerstoffs, der dabei zu Wasserstoffperoxid reduziert wird, zu Delta 4-Cholest-4en-3on oxidiert. Soll das gesamte, also freies + verestertes Cholesterin im Plasma bestimmt werden, so geht der enzymatischen Reaktion mit Cholesterinoxidase die Verseifung der Cholesterinester mittels alkalischer Hydrolyse ( 301 ) oder durch eine mikrobielle Cholesterinesterase ( 310 ) voraus. Cholesterin ist zwar der quantitativ weitaus bedeutsamste, jedoch nicht der einzige Plasma-Bestandteil, der von Cholesterinoxidase angegriffen wird. Wie FU ( 113 ) feststellt, greift Cholesterinoxidase sämtliche Delta 5- und Delta 4-3 beta-hydroxycholestane an. Deshalb kommen als Kreuzreagentien des Cholesterins in der Oxidasereaktion vor allem folgende Verbindungen in Betracht: 26-OH-Cholesterin, 25-OH-Nor-Cholesterin, Chol-5 en-3 beta, 24 diol, Pregn-5 en-3 beta, 20 alphadiol und Androst-5 en-3 beta, 17 betadiol. Praktisch spielen diese Sterole und Steroide, die auch bei gaschromatographischen Messungen des Cholesterins ( 41 ) interferieren, wegen ihrer im Vergleich zur Plasmakonzentration des Cholesterins sehr geringen Plasmakonzentration für die Beurteilung der Zuverlässigkeit der Methode keine Rolle.

Sowohl durch direkte photometrische Messung des durch die enzymatische Reaktion gebildeten Delta 4-Cholestenons als auch durch Messung des  $O_2$ -Verbrauchs in der Reaktion ist eine quantitative Auswertung der Oxidase-Reaktion möglich. Die meisten Untersucher berechnen das Ergebnis der enzymatischen Umsetzung durch Messung des  $H_2O_2$  mittels einer Farbreaktion. ALLAIN et al. ( 12 ) erhalten aus der Reaktion von  $H_2O_2$  mit 4-Amino-antipyrin und Phenol ein stabiles Chromogen, RICHMOND ( 303 ) bildet aus  $H_2O_2$  mit vierwertigem Titan und Xylenolorange einen farbgebenden Chelatkomplex. ROESCHLAU ( 310 ) entwickelt eine enzymatische Indikatorreaktion, in der aus Wasserstoffperoxid und Methanol unter der Einwirkung von Katalase Formaldehyd und Wasser entstehen



Formaldehyd bildet in Gegenwart von Ammoniumionen mit Acetylaceton eine stabile gelbe Verbindung ( Messung bei 405 - 415 nm ).

## 2. MATERIAL und METHODEN

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. DAS UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Als Untersuchungsmaterial stehen Plasmaproben von 29 Bastardhundewelpen zur Verfügung. Die Tiere sind zwischen dem 18. 7. 1972 und dem 7. 8. 1973 einem standardisierten hämorrhagischen Schock nach dem Modell von WIGGERS ( 172 ) in der Modifikation von SCHMIER ( 46 ) unterworfen worden. Von den Versuchstieren sind 15 männlichen und 14 weiblichen Geschlechts. Der jüngste Hund ist zum Zeitpunkt des Versuchs 13, der älteste 27 Tage alt; das Durchschnittsalter ist 20.8 (  $\pm 3.9$  S.D. ) Tage. Das Durchschnittsgewicht beträgt 1414 (  $\pm 442$  S.D. ) Gramm ( Bereich: 886 - 2560 Gramm ).

Die Einzelheiten der Versuchsanordnung und -durchführung sind bei HOLLMANN ( 159, 160, 161 ) beschrieben. Die folgende Zusammenfassung der wesentlichen experimentellen Schritte soll dem besseren Verständnis von Abb. 5 dienen:

Die Hundewelpen befinden sich während des Schockversuchs in einem Intensivpflegeinkubator (  $31^{\circ}\text{C}$  ) unter einer flachen Fluothane - Lachgas-Narkose. Fünf Minuten vor Beginn der Entblutung wird ihnen 5 mg / kg KG Na-Heparinat ( Liquemin<sup>R</sup> ) intravenös verabreicht. Aus der A. femoralis wird den Tieren mit einer Volumenrate von 2 ml / kg x min solange Blut entzogen, bis der arterielle Mitteldruck auf 40 mm Hg gefallen ist. Das extrakorporale Blut wird in einem Reservoir gesammelt. In der frühen Periode der Oligämie geben die meisten Tiere spontan weiter Blut ab. Sobald die Tiere 30 % des maximal abgegebenen extrakorporalen Blutvolumens aus dem Reservoir zurückgenommen haben, wird das Restblut mit der gleichen Volumenrate wie bei der Entblutung den Hunden reinfundiert. Die Versuchstiere stehen anschließend noch vier Stunden unter Beobachtung.

Blut zur Analyse wird den Hunden erstmals während der Vorbereitungsperiode entnommen. Daraus werden die Kontrollwerte bestimmt. Während der hypovolämischen Phase wird dreimal Blut abgenommen, nämlich 10 Minuten nach Ende der Entblutung, im Maximum der Blut-

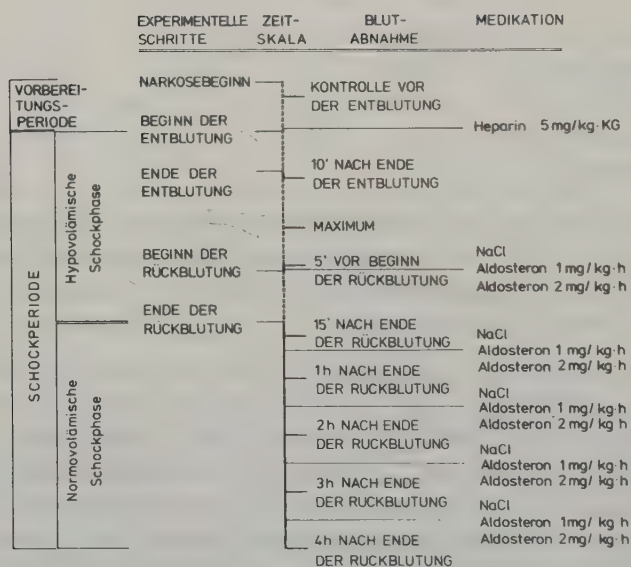


Abb. 5: Schematische Darstellung des Schockversuchs

abgabe und fünf Minuten vor Beginn der Rückblutung. 15 Minuten nach Ende der Rückblutung sowie im Abstand von jeweils 60 Minuten wird während der normovolämischen Schockphase Analysenblut gewonnen.

Den Hundewelpen der Therapiegruppe wird unmittelbar vor Beginn der Reinfusion 1 bzw. 2 mg / kg KG x h d-Aldosteron ( Aldocorten<sup>R</sup> ) i.v. infundiert. Die Behandlung wird während der gesamten normovolämischen Phase des Schockversuchs fortgesetzt. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe erhalten NaCl-Injektionen des gleichen Volumens, damit ein Elektrolyt- bzw. Volumeneffekt der Aldosteron-Therapie ausgeschlossen werden kann.

Als " Langzeitüberleber " gilt ein Tier, das wenigstens 48 Stunden nach Beendigung der Reinfusion noch am Leben ist.

Die Blutproben der Versuchstiere werden sofort nach Entnahme bei 0°C zentrifugiert; das Plasma wird in 1 ml-Aliquots geteilt und bei -20°C aufbewahrt. Die Plasmaproben werden bis zu drei Mal zur Materialentnahme aufgetaut und wieder eingefroren.

### 2.1.2. DAS MATERIAL ZUR FLÜSSIGKEITSSÄULENCHROMATOGRAPHIE

( Die in eckige Klammern gesetzten römischen Ziffern verweisen auf die Tabelle der Lieferfirmen am Ende dieses Abschnitts )

#### Säulen

Für die chromatographischen Schritte werden Borosilikatglassäulen ( Länge: 400 mm; innerer Durchmesser: 11 mm ) verwendet, die in einer Spezialwerkstätte am oberen Ende einen Schliffansatz ( NS 14 / 23 ) erhalten und am unteren Ende mit einer Fritte ( Porenweite: 40 - 90 Mikrometer ) [I], einem Sperrventil mit PTFE-Hahnkücken ( 1.5 mm, NS 12.5 ) und einem kurzen, sich nach unten verzweigenden Auslaufrohr versehen werden. Als Laufmittelvorratsgefäße ( Abb.: 6 ) dienen für die erste Chromatographie ungraduierte Tropftrichter aus Borosilikatglas, die mit einem austauschbaren PTFE-Hahnkücken ausgestattet sind und am unteren Ende einen Glasstopfen ( NS 14 / 23 ) tragen, der in den Schliffansatz der Säulen paßt und durch dessen Lumen das Laufmittel aus dem Vorratsgefäß auf die Oberfläche des Gelbetts fließen kann. Der Vorrat an Laufmittel für die zweite Chromatographie befindet sich in einem Meßkolben ( 100 ml ), der an Stelle des Bodens einen Hohlstopfen trägt, der in den Schliffansatz der Säulen paßt. Diese Vorratsgefäße werden mit einem Plastikstopfen locker verschlossen.

#### Gel

Sephadex LH-20-Gel [II] wird stets nur in frischem Zustand verwendet.

#### Radioaktive Steroide

Die tritiierten Steroide [III] besitzen eine spezifische Aktivität von 40 - 60 Curie / mMol: 1, 2-<sup>3</sup>H-Progesteron 47.8 C / mMol; 1, 2-<sup>3</sup>H-11-desoxy-corticosteron 50.0 C / mMol; 1, 2-<sup>3</sup>H-17-OH-Progesteron 40.4 C / mMol. Sofort nach Eintreffen der Lieferung werden die Lösungen der tritiierten Steroide mit einer Benzol : Äthanol ( 9 : 1 )-Lösungen im Verhältnis 1 : 200 verdünnt und bei

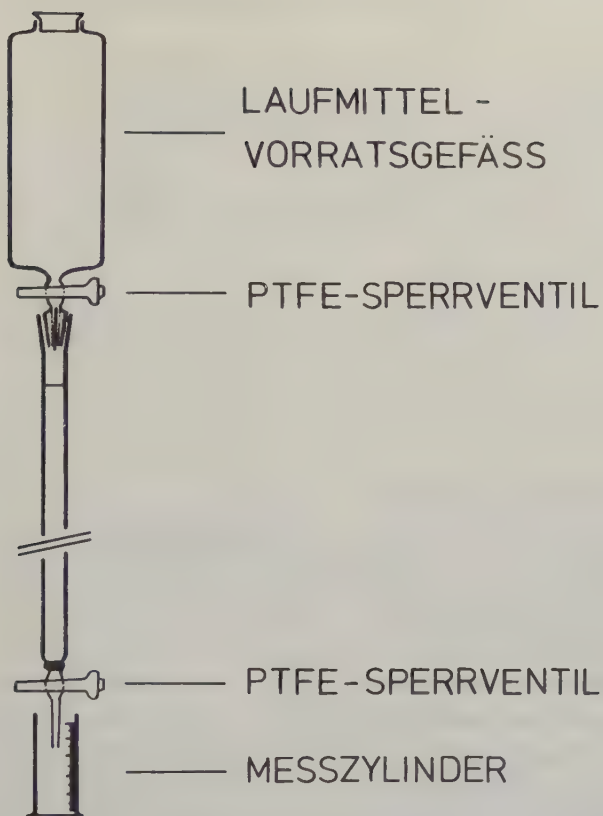
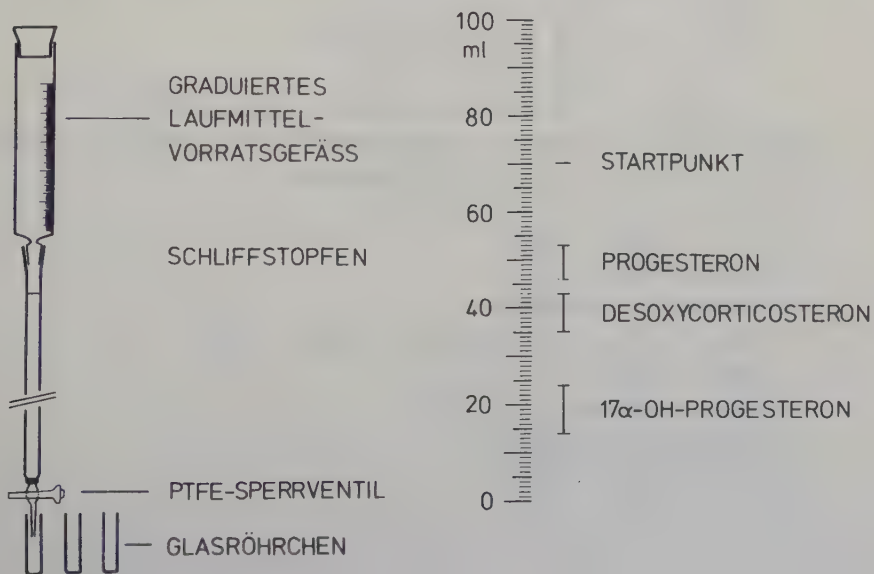


Abb. 6 :  
Chromatographie-  
Säulen mit Vor-  
ratsgefäßen  
( Oben: 1. Chro-  
matographie ;  
unten: 2. Chro-  
matographie )



4° C aufbewahrt. Entsprechend dem wechselnd großen Bedarf an radioaktivem Material werden in Abständen von 1 - 3 Monaten Aliquots dieser Verdünnung mit einer Totalkapazität von ca.  $2 \times 10^6$  cpm durch Sephadex LH 20-Chromatographie auf einer 40 cm langen Säule gereinigt. Das Eluat wird in 1 ml-Fractionen gesammelt, die darin enthaltene Radioaktivität sofort ausgezählt. Weiterverwendet werden nur diejenigen Fractionen, die wenigstens 50 % der in der Fraction mit der höchsten Radioaktivität enthaltenen cpm-Rate aufweisen. Bis zur endgültigen Verwendung werden die gereinigten Steroide in einer Benzol : Äthanol ( 9 : 1 ) - Lösung bei 4° C aufbewahrt.

#### Lösungsmittel und Lösungsmittelansätze

Alle Lösungsmittel haben Analysenqualität und werden ohne zusätzliche Reinigung verwendet.

##### Laufmittel 1 ( LF 1 ) ( 254 )

2500.0 ml ( 98 % ) Dichlormethan [IV]  
55.0 ml ( 2 % ) Methanol [IV]

##### Laufmittel 2 ( LF 2 ) ( 254 )

500.0 ml ( 50 % ) n-Heptan [IV]  
500.0 ml ( 50 % ) Chloroform [IV]  
2.5 ml ( 0.25% ) Äthanol [IV]

Aqua dest. [V] bis zur Sättigung ( 0.02 % )

Im Überschuß zugegebenes Wasser wird durch doppelte Scheidetrichter-Passage aus dem Ansatz entfernt.

##### BRAY-sche Lösung ( 47 )

( für wäßrige Lösungen )

20.0 g 2,5-Diphenyloxazol ( PPO ) [VI]  
300.0 g Naphthalin [IV]  
100.0 ml Äthylenglykol [IV]  
500.0 ml Methanol [IV]  
ad 5000.0 ml Dioxan [IV]

Toluol-Szintillator

( für nichtwäßrige Lösungen )

24.0 g 2,5-Diphenyloxazol ( PPO ) [VI]

240.0 ml Methanol [IV]

ad 5000.0 ml Toluol [IV]

Glasware

Die gesamte Glasware ( Reagenzgläser, große und kleine Schliffgläser, Meßgläser, Glaskolben, Glasstopfen, Pasteurpipetten ) wird durch mindestens dreistündiges Glühen bei 500° C steroidfrei gemacht ( 196 ).

Szintillationsmeßgerät

Die radioaktiven Proben werden im Flüssigkeitsszintillationsmeßgerät Isocap 300 [VII] mit einer Ausbeute von 65 % für Tritium gezählt. Proben mit niedriger Aktivität werden bis zu einer Totalzählrate von 10 000 cpm ( Fehlerquote: 2 % ), solche mit höherer Aktivität 10 Minuten gezählt. Zur Elimination des Zählfehlers, der durch die Chemolumineszenz der Szintillationsflüssigkeit hervorgerufen wird, wird eine Background-Zählrate von 10 cpm ( monatliche Kontrolle ) automatisch von jedem Zählwert subtrahiert.

Zählfläschchen

Zur Messung von Radioaktivitäten in nichtwäßrigen Lösungen werden Polypropylen-Zählfläschchen ( 52 x 16 mm ) [VI] , zur Messung von Radioaktivitäten in wäßrigen Lösungen werden Polyäthylen-Zählfläschchen ( 61 x 27 mm ) [VI] verwendet.

### 2.1.3. DAS MATERIAL ZUM RADIOIMMUNOASSAY

( Material für den Radioimmunoassay, das auch zur Durchführung der Chromatographie benötigt und daher unter 2.1.2. genannt wird, ist hier nicht aufgeführt.)

#### Stumme Antigene

Von den nichtradioaktiven Steroiden [IV] werden äthanolische Stammlösungen mit der einheitlichen Konzentration von 50 mg / 100 ml EtOH angesetzt und bei 4° C aufbewahrt.

#### Antikörper

Als Antikörper im Progesteron-Radioimmunoassay wird ein lyophilisiertes Antiserum [VIII] verwendet, das in Kaninchen durch Immunisierung mit einem Progesteron-C 3 -BSA-Konjugat gewonnen wird. Als Antikörper im DOC-Radioimmunoassay ( AK 24 ) wird ein lyophilisiertes Antiserum verwendet, das in Kaninchen durch Immunisierung mit einem 11-desoxy-corticosteron-C 21-Konjugat gewonnen wird. Es wird von Prof. Dr. P. Vecsei ( Heidelberg ) zur Verfügung gestellt. Als Antikörper im 17-OH-Progesteron-Radioimmunoassay wird ein Antiserum verwendet, das in Schafen durch Immunisierung mit einem 17-OH-Progesteron-hemisuccinat-BSA-Konjugat gewonnen wird. Es wird von Dr. F. Bidlingmaier ( München ) zur Verfügung gestellt.

#### Lösungsmittelansätze

0,05 m Borat-KCl-Puffer " B " ( pH = 7.8 )

6.184 g  $H_3BO_3$  [IV]  
 7.456 g KCl [IV]  
 78.000 ml NaOH ( 0.1 n ) [IV]  
 ad 2000.000 ml Aqua bidest.

Gammaglobulin-Puffer " C " 0.06 %

300.0 mg Gamma-Globulin ( human, Trockensubstanz ) [IX]  
 162.5 mg  $NaN_3$  [IV]  
 ad 500.0 ml Puffer " B "

Dextran-Kohle-Suspension

0.250 g Dextran ( Dextran T 70, MG: 70 000 ) [III]  
2.500 g Norit A [X]  
ad 100.000 ml Puffer " C "

Geräte

Die radioimmunologischen Reaktionen finden in Einmal-Polytubes [XI] statt. Zur Inkubation der RIA-Proben steht ein Rotary-Evapo-Mix [XII] mit einem Angebot von 90 Plätzen zur Verfügung. Diese Probenanzahl kann gleichzeitig in der Kühlzentrifuge RC 2 - B [XIII] zentrifugiert werden. Zur rechnerischen Bearbeitung der Meßergebnisse und zu ihrer statistischen Auswertung stehen ein Tischrechner " Combitron S + Dilector " [XIV] und ein Digitalrechner " digital pdp 11 " [XV] zur Verfügung.

## 2.1.4. DAS MATERIAL ZUR ENZYMATISCHEN CHOLESTERINBESTIMMUNG

Die enzymatische Cholesterinbestimmung wird mit der Testkombination " Cholesterin, enzymatischer Farbtest " [XVI] ( Best.-Nr.: 15 738 ) durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle werden Precimat<sup>R</sup> Cholesterin ( Konzentration: 200 mg Cholesterin / 100 ml bzw. 5.17 mMol / l; Best.-Nr.: 15 736 ) [XVI] und durch i.v.-Punktion gewonnenes Plasma eines jugendlichen männlichen Erwachsenen verwendet. Für die photometrischen Messungen steht ein Spektralphotometer [XVII] ( PMQ II ) mit Mikrotrogküvette ( MT 4 ) zur Verfügung.

Tabelle der Lieferfirmen

|        |                                                          |
|--------|----------------------------------------------------------|
| [I]    | : SCHOTT, Mainz                                          |
| [II]   | : PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala ( Schweden )         |
| [III]  | : NEW ENGLAND NUCLEAR CORP., Boston, MA, U.S.A.          |
| [IV]   | : MERCK AG, Darmstadt                                    |
| [V]    | : DR. FRESENIUS KG, Bad Homburg                          |
| [VI]   | : WERNER ZINSSER, Frankfurt                              |
| [VII]  | : NUCLEAR CHICAGO                                        |
| [VIII] | : BIOLAB, Brüssel ( Belgien )                            |
| [IX]   | : DEUTSCHE KABI-GmbH, ( München )                        |
| [X]    | : SERVA, Heidelberg                                      |
| [XI]   | : CLINIMED GERÄTE GmbH, Langenfeld                       |
| [XII]  | : BUCHLER INSTRUMENTS DIVISION                           |
| [XIII] | : IYAN SORVALL, Inc. Newtown, Connecticut U.S.A.         |
| [XIV]  | : DIEHL Rechenmaschinen, Nürnberg                        |
| [XV]   | : DIGITAL EQUIPMENT INTERNATIONAL ltd, Galway ( Irland ) |
| [XVI]  | : BOEHRINGER, Mannheim                                   |
| [XVII] | : ZEISS, Oberkochen                                      |

## 2.2. METHODEN

### 2.2.1. DAS METHODISCHE VORGEHEN BEI ANSATZ UND EXTRAKTION DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS ( Abb.: 7 )

Die tiefgefrorenen (  $-20^{\circ}\text{C}$  ) Aliquots des Untersuchungsmaterials werden auf Zimmertemperatur erwärmt und anschließend 60 sec bei 10 000 U/min zentrifugiert. Im Regelfall 250 Mikroliter Plasma ( wenn die Menge des vorhandenen Untersuchungsmaterials zu gering ist, nur 200 oder 100 Mikroliter Plasma ) werden aus den Vorratsgefäßen quantitativ in Spitzbodengläser überführt. Dazu muß das Ansatzvolumen frei von Fibringerinnsehlen sein, deren Anwesenheit die Menge des eingesetzten Plasmas verfälschen kann. Den Plasmaeinsätzen wird Aqua destillata (  $4^{\circ}\text{C}$  ) bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml zugesetzt. Um die durch Extraktion und chromatographische Reinigung verursachten Mengeneinbußen für jedes einzelne Steroid exakt bestimmen zu können, werden in die Spitzbodengläser außerdem jeweils ca. 1 200 cpm ( = 3.4 pg )  $^3\text{H}$ -Progesteron,  $^3\text{H}$ -11-Desoxycorticosteron und  $^3\text{H}$ -17-OH-Progesteron ( jeweils gelöst in einem Volumen von 150 Mikroliter Puffer "C" ) pipettiert. Zur exakten Bestimmung dieser als " interner Standard " dienenden Mengen tritiiertster Steroide werden je zwei weitere 150 Mikroliter-Volumina direkt in Szintillationsgefäße eingebracht und 10.0 ml BRAY-scher Lösung zugegeben. Die Zählrate des "internen Standards" wird zusammen mit den zur Berechnung der individuellen Wiederfindungen dienenden Aktivitäten im Anschluß an die chromatographischen Schritte bestimmt. Die Ansatzgläser werden mit einem Schliffstopfen verschlossen, zehn Sekunden auf dem VORTEX-Mixer geschüttelt und mindestens zwei Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  zur Gleichgewichtseinstellung aufbewahrt.

Zur Extraktion der Steroide werden die Ansatzvolumina ( insgesamt 1.45 ml ) mit je 5.0 ml Dichlormethan (  $4^{\circ}\text{C}$  ) überschichtet. Jedes Ansatzglas wird anschließend exakt zwei Minuten in einer Neigung von 45 Grad von Hand wiegend geschüttelt und in der Kühlzentrifuge (  $4^{\circ}\text{C}$  ) fünf Minuten bei 3 000 U/min zentrifugiert. Das Resultat ist eine scharfe Trennung von Extraktionsmittelphase ( unten ) und wäßriger Phase ( oben ). Die Extraktionsmittelphase wird

mittels modifizierter ausgeglühter PASTEUR-Pipetten und unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe in ein großes Spitzboden-Schliffglas überführt. Damit keine Steroide in den kapillarartigen Schenkeln der modifizierten PASTEUR-Pipetten zurückbleiben, wird jede Pipette nach dem Absaugvorgang mit 1 - 2 ml reinen Dichlormethans durchgespült. Dieser Extraktionsschritt wird mit der wäßrigen Phase, die im Ansatzglas zurückbleibt, wiederholt. Die nach der zweiten Dichlormethanextraktion zurückbleibende wäßrige Phase wird verworfen, während die vereinigten Extraktionsmittelvolumina mit den darin enthaltenen Steroiden zur Beseitigung der nicht flüchtigen Anteile mit 3.0 ml sterilem Aqua destillata ( 4° C ) aufgegossen werden. Die Schliffgläser werden anschließend 15 sec auf dem VORTEX-Mixer kräftig geschüttelt. Nach kurzer Pause, in der eine ausreichend scharfe spontane Phasentrennung, die eine weitere Zentrifugation überflüssig macht, eintritt, wird die organische Phase ( unten ) mit Hilfe der Absaugvorrichtung ( gleiche modifizierte PASTEUR-Pipette ! ) in ein neues Schliffglas überführt. Einem großzügigen Absetzen der organischen von der wäßrigen Phase wird der Vorzug gegeben vor dem Versuch, die Dichlormethanphase quantitativ in das zweite Schliffglas zu überführen. Wenn sich die chromatographische Reinigung des Plasmaextrakts nicht sofort an die Extraktion anschließt, werden die Schliffgläser mit Stopfen verschlossen und bei 4° C ( maximal 24 Stunden ) aufbewahrt.

Die parallele Extraktion von sechs Probenabsätzen erfordert einen Zeitaufwand von etwa einer Stunde.

#### 2.2.2. DAS METHODISCHE VORGEHEN BEI DER FLÜSSIGKEITS-SÄULENCHROMATOGRAPHIE ( Abb.: 7 )

##### Vorbereitung der Säulen

Zwei Garnituren von je sechs Säulen werden für die Chromatographie vorbereitet. Die erste Säulengarnitur wird mit Sephadex LH-20, das in Laufmittel 1 gequollen ist, die zweite Säulengarnitur mit Sephadex LH-20, das in Laufmittel 2 gequollen ist, gefüllt. Für jede Säule wird mit einem Bedarf von ca. 10 g trockenen Gels

gerechnet.

Eine zur einzeitigen Füllung aller Säulen ausreichende Gelmenge wird mit Laufmittel 1 bzw. Laufmittel 2 ( 1 g Sephadex : 5.0 ml Laufmittel ) im ERLLENMEYER-Kolben angesetzt. Das gegenüber dem quellenden Gel spezifisch schwerere Laufmittel 1 setzt sich alsbald am Boden des Gefäßes ab, während das zum quellenden Gel spezifisch leichtere Laufmittel 2 über der Gelphase schwimmt. Durch vorsichtiges Schütteln der Ansatzkolben wird der Kontakt zwischen Gel und Laufmittel verbessert. Die Ansätze werden über Nacht bei 4° C aufbewahrt.

Bevor das gequollene Gel eingefüllt wird, werden die Säulen mit Chloroform und Methanol gespült und anschließend im Wärmeschrank ( 40° C ) getrocknet. Die Durchlässigkeit der Fritten wird mit einer kleinen Menge Laufmittel geprüft. Dieses Volumen wird bis auf eine etwa 5 cm hohe Flüssigkeitssäule, die über der Fritte stehen bleibt , abgelassen. Mit Hilfe ausgeglühter PASTEUR-Pipetten wird das gequollene Gel portionsweise in die Säulen gefüllt. Die Absperrhähne bleiben unterdessen dauernd geöffnet, so daß das Gel langsam sedimentiert. Das gequollene Gel soll beim Einfüllen an den Säuleninnenwänden ablaufen. Während des gesamten Füllvorgangs wird das Gelbett durch einen ausreichenden Laufmittel-Überschuss vor dem Kontakt mit Luft geschützt. Dadurch wird die Entstehung von Luftblasen in den Gelpackungen verhindert. ( Entstehen im Gelbett der Säulen der ersten Garnitur Luftblasen, so werden sie durch absinkendes Laufmittel bei geschlossenem Sperrhahn ausgetrieben. Luftblasen im Gelbett von Säulen der zweiten Garnitur können nur mechanisch entfernt werden.) Bei den Säulen der ersten Garnitur beträgt die Füllhöhe 40 cm, bei den LF 2 - Säulen 37 cm. Gelkörnchen, die an den Säuleninnenwänden oberhalb der Füllmarke haften, werden sorgfältig entfernt. Nach dem Packen werden die Säulen mit der Laufmittelmenge, die dem doppelten Volumen des Gelbetts entspricht, eluiert. Am folgenden Tag werden die Säulen in Betrieb genommen.

### Erste Chromatographie

Die Extraktionsmittelvolumina werden in einem temperierten Wasserbad ( 45° C ) unter sanftem Stickstoffstrom vollständig ein-

getrocknet. Der Trockenextrakt wird in 0.250 ml LF 1 quantitativ gelöst. Dieses Volumen wird mit einer 1 ml-Tuberkulinspritze auf die trockene Oberfläche des Gelbetts vorsichtig aufgebracht. Das Sperrventil ist dabei geöffnet. Mit der gleichen Laufmittelmenge wird nachgespült. Man achtet darauf, daß die Spitze der Spritzenkanüle so nahe an die Oberfläche des Gelbetts herangebracht wird, daß beim Auftragen keine Materialverluste dadurch entstehen, daß die Säuleninnenwände benetzt werden. Dann wird der mit Laufmittel gefüllte Vorratskolben auf die Säule gesetzt. Man öffnet den Sperrhahn des Vorratskolbens so vorsichtig, daß sich die Oberfläche des Gelbetts durch das fließende Laufmittel eben mit einem Flüssigkeitsfilm bedeckt. Während der Elution muß gelegentlich der Laufmittelzufluß aus dem Vorratsgefäß nachreguliert werden.

Die ersten 15 ml des Eluats werden in einem Meßkolben gesammelt und verworfen. Die zweiten 15 ml, in denen die Fraktionen von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron enthalten sind, werden in graduierten Reagenzgläsern aufgefangen und in einem temperierten (  $45^{\circ}\text{C}$  ) Aluminiumblock unter sanftem Stickstoffstrom eingetrocknet. Im Anschluß an die Elution von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron werden die Säulen zur Reinigung des Gelbetts mit 80 ml LF 1 nachgespült. Die Spülvolumina werden verworfen. Eine Säule ist wieder startklar, sobald insgesamt 110 ml Laufmittel eluiert sind.

Zur erstmaligen Analyse der Elutionsgrenzen der wichtigsten NNR-Steroide auf den Säulen der ersten ( ebenso der zweiten ) Chromatographie werden jeweils ca. 1500 cpm der tritiierten Substanzen eingesetzt. Dabei wird das Eluat in Fraktionen von 1 ml Volumen gesammelt. Lokalisationsexperimente mit dem Ziel, die Konstanz des Elutionsmusters einer einzelnen Säule während eines längeren Betriebszeitraums sowie die Parallelität des Elutionsmusters unter sämtlichen Säulen zu prüfen, werden mit Mischungen gleicher Aktivitäten ( ca. 1500 cpm ) der jeweiligen Steroide durchgeführt.

Die sechs Säulen werden nacheinander in nicht festgelegter Reihenfolge gestartet. Infolge der geringen Elutionsgeschwindigkeit ( ca. 0.5 ml / min ) erstreckt sich die Chromatographie über annähernd vier Stunden. Da Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron

jedoch nach einer Stunde eluiert werden und anschließend sofort weiterverarbeitet werden können, kann man den Start der zweiten Chromatographie etwa zur Mitte der Elutionszeit der ersten Chromatographie einleiten.

### Zweite Chromatographie

Der Trockenrückstand des die Fraktionen von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron enthaltenden Eluates der ersten Chromatographie wird in 0.250 ml LF 2 quantitativ gelöst. Mittels einer 1 ml-Tuberkulinspritze wird dieses Volumen auf die trockene Oberfläche des Gelbetts der LF 2 - Säulen aufgetragen. Mit der gleichen Laufmittelmenge wird nachgespült. Das Sperrventil der Säulen ist dabei geöffnet. Nach ca. 30 sec ist das gesamte aufgetragene Laufmittelvolumen ins Gelbett eingedrungen. Mit PASTEUR-Pipetten wird zunächst noch in kleinen Mengen LF 2 auf das Gel aufgebracht. Damit das Gelbett nicht aufgewirbelt wird, läßt man das Laufmittel tropfenweise an den Säuleninnenwänden ablaufen. Wenn etwa 5 ml Laufmittel aufgetragen sind, besteht keine Gefahr mehr, daß das Gelbett bei weiterem Auffüllen in Mitleidenschaft gezogen wird. Mit größeren Laufmittelportionen wird die Säule bis zum Schliffunterrand gefüllt, dann wird das Vorratsgefäß aufgesetzt und bis zur Marke: 70 ml mit Laufmittel aufgefüllt.

Das Elutionsmuster für Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron ist auf der Meßskala des Laufmittel-Vorratsgefäßes eingezeichnet. Nach den dort angebrachten Markierungen wird jede Säule zeitlich unabhängig von der Elution auf Parallelsäulen eluiert. Steroidfreies Eluat wird von allen Säulen der zweiten Chromatographie vor der Elution der Steroidextrakte gesammelt und "gepoolt".

Die Eluatvolumina, in denen Progesteron bzw. DOC bzw. 17-OH-Progesteron enthalten sind, werden in gekennzeichneten Reagenzgläsern gesammelt und im Aluminiumblock (  $45^{\circ}\text{C}$  ) unter sanftem Stickstoffstrom vollständig eingedampft. Der Trockenrückstand wird in 2.000 ml Äthanol (  $20^{\circ}\text{C}$  ) gelöst. Die Äthanolvolumina werden nach folgendem für die drei Steroide gültigen Muster aufgeteilt:

Für die Berechnung der Wiederfindung: 1 x 0.400 ml ( =20 % )

Für den Radioimmunoassay: 2 x 0.750 ml ( =37.5 % )

Die Aliquots, aus deren Zählraten die Wiederfindungen berechnet werden, werden unmittelbar in Szintillationsfläschchen pipettiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuumofen (  $40^{\circ}\text{C}$  ) entfernt. Nach Zugabe von 0.150 ml Puffer "C" und 10.0 ml BRAY'scher Szintillationslösung wird die Radioaktivität gemessen.

Die Aliquots, in denen die unbekannten Steroidmengen radioimmunologisch bestimmt werden sollen, werden in Polytubes bei  $4^{\circ}\text{C}$  längstens 72 Stunden aufbewahrt.

### 2.2.3. DAS METHODISCHE VORGEHEN BEIM RADIOIMMUNOASSAY ( Abb.: 7 )

Die radioimmunologische Bestimmung der chromatographisch gereinigten Plasmasteroide wird mit dem Material aus 4 - 6 Chromatographien durchgeführt.

Für den Progesteron-RIA stehen zur Verfügung:

|                                                  |                                   |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Eichlösungen:                                    | 0.500 ng / ml = 50 pg / 0.100 ml  |
| (äthanolisch)                                    | 1.000 ng / ml = 100 pg / 0.100 ml |
|                                                  | 2.500 ng / ml = 250 pg / 0.100 ml |
|                                                  | 5.000 ng / ml = 500 pg / 0.100 ml |
| $^3\text{H}$ -Progesteron-Lösung in Puffer "C" : | ca. 6000 cpm / 0.100 ml           |
| Progesteron-AK-Verdünnung in Puffer "C" :        | Nach Angabe der Firma             |

Für den DOC-RIA stehen zur Verfügung:

|                                          |                                   |
|------------------------------------------|-----------------------------------|
| Eichlösungen:                            | 0.500 ng / ml = 50 pg / 0.100 ml  |
| (äthanolisch)                            | 1.000 ng / ml = 100 pg / 0.100 ml |
|                                          | 2.000 ng / ml = 200 pg / 0.100 ml |
|                                          | 4.000 ng / ml = 400 pg / 0.100 ml |
| $^3\text{H}$ -DOC-Lösung in Puffer "C" : | ca. 6000 cpm / 0.100 ml           |
| DOC-AK-Verdünnung in Puffer "C" :        | 1 : 11 500                        |

Für den 17-OH-Progesteron-RIA stehen zur Verfügung:

---

|               |                                   |
|---------------|-----------------------------------|
| Eichlösungen: | 0.500 ng / ml = 50 pg / 0.100 ml  |
| (äthanolisch) | 1.000 ng / ml = 100 pg / 0.100 ml |
|               | 2.500 ng / ml = 250 pg / 0.100 ml |
|               | 5.000 ng / ml = 500 pg / 0.100 ml |

$^3\text{H}$ -17-OH-Progesteron-Lösung in Puffer "C" : ca. 6000 cpm /  
0.100 ml

17-OH-Progesteron-AK-Verdünnung in Puffer "C" : 1 : 12 000

Aus dem steroidfreien Säuleneluat wird das Lösungsmittel durch Abdampfen entfernt. Der Rückstand wird in Äthanol gelöst. Das Äthanolvolumen wird nach dem Gesamtvolumen des steroidfreien Eluats und dem Volumen der vereinigten steroid ( P bzw. DOC bzw. 17-OH-P ) haltigen Fraktionen bemessen.

Es gilt die Formel:

$$\text{Äthanolvolumen ( ml )} = \frac{\text{Gesamtvolumen des steroidfreien Eluats}}{\text{Gesamtvolumen der steroid ( P bzw. DOC bzw. 17-OH-P ) haltigen 1 ml Fraktionen}} \times 2$$

Jede Eichreihe besteht aus Duplikaten des Standards ( zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität ), des Nullwerts ( zur Bestimmung der Radioaktivität, die vom AK bei Abwesenheit stummen Ag gebunden wird ) und von vier Eichwerten mit definierten Mengen des stummen Antigens ( Progesteron: 50, 100, 250, 500 pg; DOC: 50, 100, 200, 400 pg; 17-OH-P: 50, 100, 250, 500 pg ). Die definierten Mengen des stummen Antigens, enthalten in jeweils 0.100 ml der äthanolischen Steroideichlösungen, werden in Polytubes überführt. In die Polytubes sämtlicher Eichreihenwerte werden anschließend, in Entsprechung zum Verfahren bei der Teilung der steroidhaltigen Eluate, jeweils 0.750 ml aus der äthanolischen Lösung des steroidfreien Säuleneluats pipettiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuumofen ( 40° C ) entfernt. Anschließend gelangen in die RIA-Röhrchen je 0.100 ml der Pufferlösungen der tritierten Steroide und zur Einleitung der Antigen-Antikörper-Reaktion jeweils 0.500 ml der Antikörpervedünnungen. In die Poly-

tubes der Eichreihenstandards pipettiert man statt 0.500 ml Antikörperverdünnung die gleiche Menge Puffer "C". Die RIA-Röhrchen werden im Schüttelinkubator ( Wassertemperatur:  $37^{\circ}\text{C}$  ) eine Stunde inkubiert. Eine zweistündige Inkubation im Eisbad (  $0-4^{\circ}\text{C}$  ) schließt sich an. Nach Ablauf dieser Zeit werden in die RIA-Röhrchen, und zwar noch während sie sich im Eisbad befinden, je 0.100 ml der Dextran-Kohle-Suspension zur Adsorption des nicht-antikörpergebundenen Steroids pipettiert. Die Polytubes mit den Eichreihenstandards werden mit 0.100 ml Puffer "C" aufgefüllt, das Volumen der Kohlesuspension muß quantitativ in den RIA-Ansatz eingebracht werden; die Innenwände der Polytubes dürfen dabei nicht benetzt werden. Die RIA-Röhrchen werden ca. 15 sec. vorsichtig von Hand horizontal geschwenkt und weitere 15 min im Eisbad inkubiert. Anschließend werden sie in der Kühlzentrifuge (  $0^{\circ}\text{C}$  ) bei 3000 U / min 15 min lang zentrifugiert. Der kohlefreie Überstand des RIA-Ansatzes wird manuell aus den RIA-Röhrchen in Polyäthylen-Szintillationsfläschchen dekantiert. Die Szintillationsfläschchen werden mit 10 ml BRAY'scher Lösung gefüllt, verschlossen, kräftig geschüttelt und bis zur Messung der cpm-Rate im Szintillationszähler mindestens zwei Stunden im Dunkeln aufbewahrt.

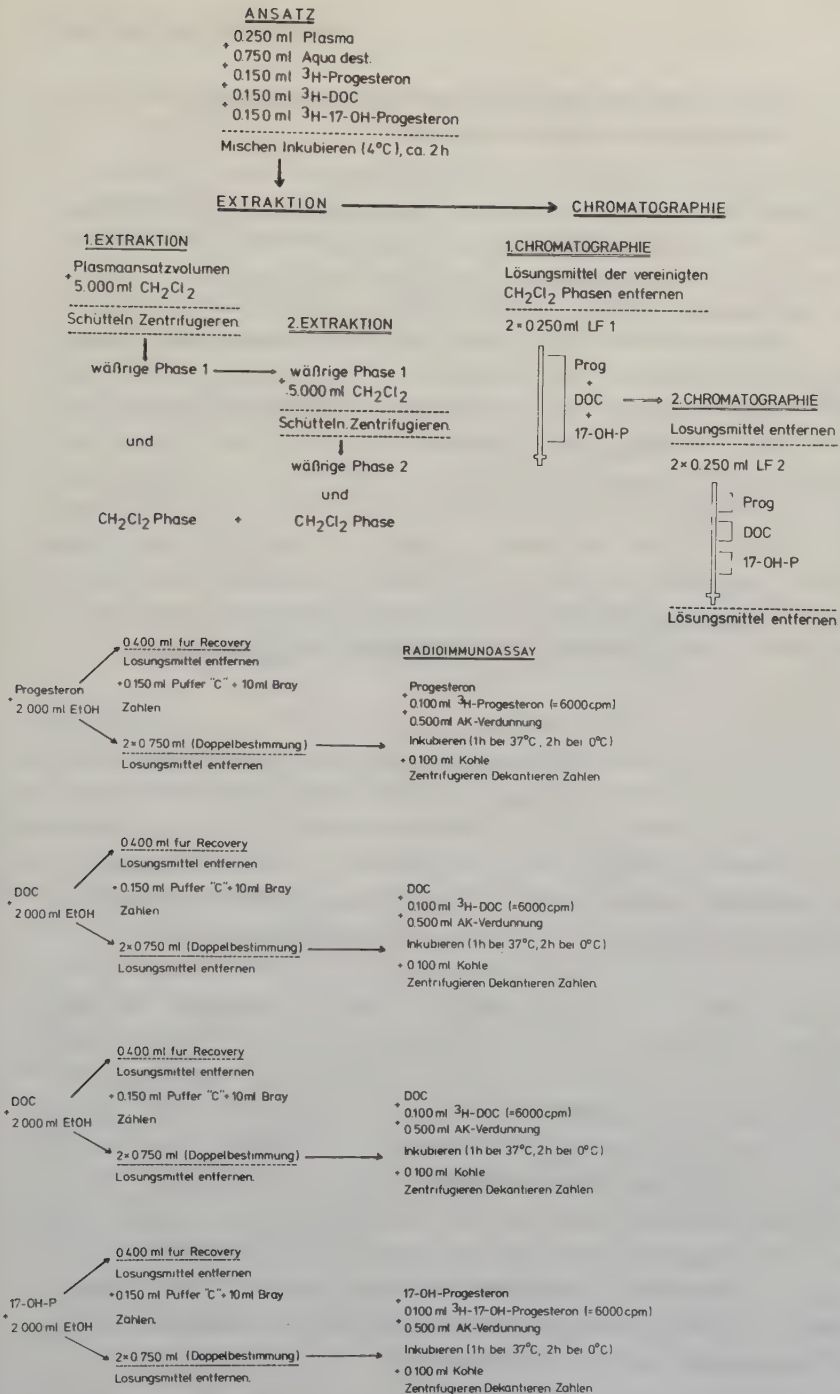


Abb. 7 : Schematische Darstellung der Steroidanalyse

#### 2.2.4. DAS METHODISCHE VORGEHEN BEI DER RECHNERISCHEN AUSWERTUNG DER MESSERGEBNISSE

Die Standardkurven der Radioimmunoassays werden durch lineare Auftragung der in den Eichreihenwerten eingesetzten Steroidmengen ( pg ) auf der x-Achse und der Mittelwerte der korrespondierenden Zählraten ( cpm ) des AK-gebundenen markierten Steroids auf der y-Achse eines Achsenkreuzes graphisch dargestellt. Eine lineare Regressionsfunktion erster Art ( ungruppierte Stichproben; zwei Variablen:  $x = \text{pg}$  der in den Werten der Eichreihe eingesetzten Steroidmengen ,  $y = \text{Kehrwerte der Mittelwerte der korrespondierenden Zählraten des AK-gebundenen markierten Steroids}$  ) dient zur mathematischen Auswertung der Meßergebnisse der unbekannten Proben. Dieses Verfahren entspricht dem von HALES & RANDLE ( 142 ) angegebenen und von WOMBACHER & KÖRBER ( 418 ) theoretisch begründeten Verfahren zur Linearisierung von Standardkurven in Radioimmunoassays. Die grundlegende Formel lautet :

$$\frac{c_0}{c_i} = \frac{1}{i_0} i + 1$$

$c_0$  :  $^+ \text{AgAK}$  des Nullwerts                       $i_0$  : Konzentration des  $^+ \text{Ag}$

$c_i$  :  $^+ \text{AgAK}$  der Proben                               $i$  : Konzentration des  $\text{Ag}$

Daraus hat MURPHY ( 252 ) die für den Sättigungsbereich von Antigen-Antikörper-Reaktionen gültige verallgemeinerte hyperbolische Bezugskurve  $1/y = ax + b$  abgeleitet. Die aus der Regressionsfunktion erhaltenen Rohwerte werden gegen das Volumen des eingesetzten Untersuchungsmaterials, prozedurale Verluste und durch Teilungsschritte verursachte Materialeinbußen korrigiert. Die Hormonkonzentrationen werden in der Einheit ng/ml angegeben. Die rechnerische Auswertung der radioimmunologischen Meßdaten wird auf dem Prozeßrechner ( Programm: Henning BECKER, Thomas BRÜNIG ) durchgeführt. Die Zuverlässigkeitskriterien der radioimmunologischen Bestimmungen werden mit den unter 1.2.3.3. aufgeführten Verfahren geprüft.

Die statistische Auswertung der am Untersuchungsmaterial ermittelten Meßergebnisse umfaßt folgende Schritte :

- Berechnung von arithmetischem Mittel, Standardabweichung, Varianz und Variationskoeffizient sowie der Standardabweichung des Mittelwerts in den einzelnen Stichproben
- Prüfung der Stichproben auf Normalverteilung
- Prüfung der Stichproben auf Homogenität der Varianzen ( F-Test )
- Prüfung von Differenzen zwischen den Stichprobenmittelwerten mit t-Test und Vorzeichenrangtest nach WILCOXON
- Prüfung der Korrelation zwischen normalverteilten Stichproben

#### 2.2.5. ZUM METHODISCHEN VORGEHEN BEI DER ENZYMATISCHEN CHOLESTERINBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Fraktionen des Plasmacholesterins nach der " Mikrolitermethode: Cholesterin, enzymatischer Farbtest " folgt der Arbeitsanleitung auf dem Beipackzettel der Testkombination. Es wird natives ( nichtenteiweißtes ) Plasma verwendet; das Cholesterinreagenz wird vor jedem Analysengang frisch hergestellt. Die Probenansätze werden 60 min bei 37° C im Schüttelinkubator inkubiert. Wegen der beschränkten Platzkapazität des Schüttelinkubators können pro Analysengang nur 20 Plasmaproben, d.h. 19 Testplasmen und ein Ansatz zur Qualitätskontrolle bearbeitet werden. Die photometrischen Messungen werden am Spektralphotometer bei 410 nm Wellenlänge durchgeführt. Dabei werden die Proben unmittelbar nach dem zugehörigen Probenleerwert gemessen. Die Cholesterinkonzentrationen werden in der Einheit mMol/l angegeben. Die Konzentrationen für verestertes Plasmacholesterin werden aus der Differenz zwischen den Konzentrationen für das gesamte und das freie Cholesterin errechnet.

Außerdem werden aus den Meßwerten folgende Quotienten errechnet:

Freies Cholesterin

Gesamtcholesterin

und

Freies Cholesterin

Verestertes Cholesterin

Da erstens aus der gleichen Plasmaprobe sowohl freies als auch Gesamtcholesterin bestimmt werden und da zweitens nur sehr geringe Mengen Plasma für die Cholesterinbestimmung zur Verfügung stehen - die Alternativlösung, eine Bestimmung von freiem und Gesamtcholesterin aus jeweils 0.020 ml unverdünnter Probe wird aus Gründen der Pipettiergenauigkeit abgelehnt - , wird die Arbeitsanleitung der Lieferfirma folgendermaßen modifiziert :

- Die Bestimmung wird aus 0.050 ml Plasma durchgeführt. Diese Plasamenge wird mit 0.500 ml NaCl-Lösung ( 0.9 % ) verdünnt; von dieser Probenverdünnung ( 0.550 ml ) werden jeweils 0.100 ml zur Bestimmung des freien sowie des freien + veresterten Cholesterins ( = Gesamtcholesterins ) eingesetzt .
- Die zur Durchführung der Analysen verwendete Menge von Cholesterinreagenz und Cholesterinoxidase wird gegenüber den Angaben der Arbeitsanleitung halbiert.
- Cholesterinreagenz, das zur Bestimmung des freien + veresterten Cholesterins verwendet wird, wird mit Cholesterinesterase angesetzt. Cholesterinreagenz, mit dem nur freies Cholesterin gemessen wird, enthält keine Cholesterinesterase.

Dadurch, daß sowohl das zur Verdünnung eingesetzte Plasmavolumen als auch die Volumina der NaCl-Lösung und des Cholesterinreagenz halbiert werden, sind keine Konsequenzen für die rechnerische Auswertung der Meßergebnisse aus dieser Modifikation des Arbeitschemas zu ziehen.

Die bei Einsatz von verdünnter Probe und spektralphotometrischer Messung bei 410 nm Wellenlänge zur Berechnung der Konzentration von Gesamtcholesterin gültige Formel :  $c = 38.0 \times E_{\text{Probe}}$  (mMol/l)

Kurzschema zur modifizierten Methodik der enzymatischenBestimmung von freiem und Gesamtcholesterin im Plasma

0.050 ml Plasma werden mit 0.500 ml NaCl-Lösung ( 0.9 % ) verdünnt und gut gemischt .

| Bestimmung des freien Cholesterins         |          |                                                   | Bestimmung des Gesamtcholesterins          |          |  |
|--------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------|--|
| Proben-leerwert                            | Probe    | Reagentien                                        | Proben-leerwert                            | Probe    |  |
| 0.100 ml                                   | -----    | verdünntes Plasma                                 | 0.100 ml                                   | -----    |  |
| 2.500 ml                                   | -----    | Cholesterinreagenz ohne Cholesterin -<br>esterase | -----                                      | -----    |  |
| -----                                      | -----    | Cholesterinreagenz mit Cholesterin -<br>esterase  | 2.500 ml                                   | -----    |  |
| Mischen.                                   |          |                                                   | Mischen.                                   |          |  |
| -----                                      | 0.010 ml | Cholesterinoxidase                                | -----                                      | 0.010 ml |  |
| -----                                      | 1.250 ml | jeweiliger Proben-leerwert                        | -----                                      | 1.250 ml |  |
| Mischen.<br>Inkubieren.<br>Photometrieren. |          |                                                   | Mischen.<br>Inkubieren.<br>Photometrieren. |          |  |

kann auch zur Berechnung des freien Cholesterins verwendet werden.

Im Cholesterinreagenz, mit dem freies Cholesterin bestimmt wird, fehlt die Cholesterinesterase; der dadurch hervorgerufene Volumenfehler ist mit 0.38 % des Gesamtvolumens jedoch vernachlässigbar klein und liegt unter der Pipettierfehlergrenze .

Das auf der vorhergehenden Seite abgebildete Kurzschemata gibt einen Überblick über die modifizierte Arbeitsanleitung zur Bestimmung des freien sowie des freien + veresterten = Gesamtcholesterins im Plasma .

## 3. E R G E B N I S S E

3.1. ERGEBNISSE DES METHODISCHEN VORGEHENS UND DER METHODEN-  
PRÜFUNG3.1.1. ERGEBNISSE DER ARBEITSWEISE BEI ANSATZ UND EXTRAKTION  
DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS

Die Wiederfindungsraten, die bei Routinemessungen im Anschluß an die chromatographischen Schritte ermittelt werden, kennzeichnen die Materialverluste, die aus Extraktion u n d säulenchromatographischer Reinigung des Untersuchungsmaterials resultieren. Um zu prüfen, welchen Verlustanteil die Dichlormethan-Extraktion trägt, werden bei sechs Probenansätzen, die jeweils nur mit einem Tracersteroid versetzt sind, die Wiederfindungsraten bereits nach der Extraktion gemessen ( Tab. 4 ).

|                                | MW $\pm$ SD ( % ) | BEREICH ( % ) | VK   |
|--------------------------------|-------------------|---------------|------|
| PROGESTERON<br>( n = 6 )       | 87.5 $\pm$ 3.7    | 83.8 - 92.9   | 4.17 |
| DOC<br>( n = 6 )               | 90.3 $\pm$ 3.3    | 85.8 - 96.0   | 3.69 |
| 17-OH-PROGESTERON<br>( n = 6 ) | 88.2 $\pm$ 2.8    | 83.1 - 90.8   | 3.11 |

Tab. 4 : Wiederfindungsraten von ( $^3\text{H}$ -) Progesteron, ( $^3\text{H}$ -) DOC und ( $^3\text{H}$ ) 17-OH-Progesteron nach Routineextraktion mit Dichlormethan

Wie der Aufstellung zu entnehmen ist, gehen durch das Extrahieren des Probenmaterials jeweils ca. 10 % der Hormonmengen verloren. In einem weiteren Experiment wird ermittelt, welchen Prozentanteil an der Gesamt-Wiederfindungsrate jeder der beiden Extraktionsschritte hat. Die Wiederfindungsergebnisse nach dem ersten Ausschütteln sind nahezu identisch mit den endgültigen Raten; der zweite Extraktionsschritt hat für die Werte der Gesamtwiederfindung also untergeordnete Bedeutung ( Tab. 5 ).

|                                | 1. Ausschütteln (%) | 2. Ausschütteln (%) |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| PROGESTERON<br>( n = 3 )       | 89.1                | 1.0                 |
| DOC<br>( n = 3 )               | 91.4                | 1.1                 |
| 17-OH-PROGESTERON<br>( n = 3 ) | 86.2                | 0.7                 |

Tab. 5 : Wiederfindungsraten von ( $^3\text{H}$ -) Progesteron, ( $^3\text{H}$ -) DOC und ( $^3\text{H}$ -) 17-OH- Progesteron bei fraktionierter Extraktion mit Dichlormethan

Die Differenz zwischen der Summe der bei fraktionierter Extraktion gemessenen Wiederfindungsraten und den Gesamt-Wiederfindungen nach Extraktion erklärt sich aus den Verlusten, die bei der Reinigung des Dichlormethan-Extrakts mit Wasser und der anschließenden Gewinnung des definitiven Extraktionsmittelvolumens auftreten.

Tab. 6 enthält die Wiederfindungsraten von ( $^3\text{H}$ -) Progesteron, ( $^3\text{H}$ -) DOC und ( $^3\text{H}$ -) 17-OH- Progesteron nach Extraktion mit den zur Extraktion von Progesteron und anderer niedrigsubstituierter Steroidhormone mehrfach empfohlenen Lösungsmitteln Petroläther und n-Hexan. Das methodische Vorgehen entspricht dem für die Dichlormethan-Extraktion beschriebenen Verfahren. Die Ergebnisse dieser Versuche sind den Resultaten der  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktion unterlegen.

|                   | Wiederfindung in<br>Petroläther (%) | Wiederfindung in<br>n-Hexan (%) |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| PROGESTERON       | 76.5                                | 67.1                            |
| DOC               | 38.8                                | 84.8                            |
| 17-OH-PROGESTERON | 56.3                                | 62.9                            |

Tab. 6 : Wiederfindungsraten von ( $^3\text{H}$ -) Progesteron, ( $^3\text{H}$ -) DOC und ( $^3\text{H}$ -) 17-OH-Progesteron nach Extraktion mit Petroläther und n-Hexan

### 3.1.2. ERGEBNISSE DER ARBEITSWEISE BEI DER FLÜSSIGKEITSSÄULEN- CHROMATOGRAPHIE

#### Lokalisation

Das für die 1. Chromatographie ( Gel: Sephadex LH 20; Laufmittel: Dichlormethan : Methanol 98 : 2; Länge des Gelbetts: 40 cm ) typische Elutionsmuster von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron zeigt Abb. 8.

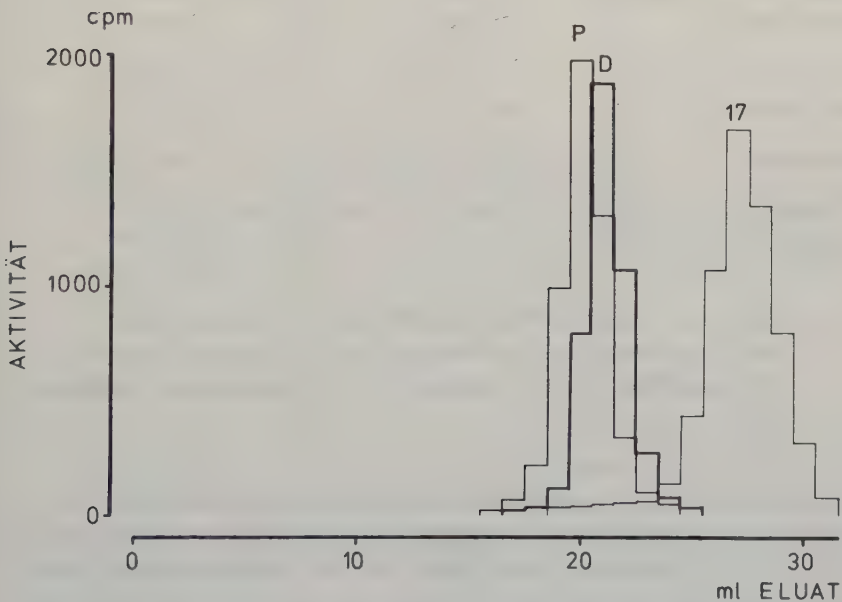


Abb. 8 : Typisches Elutionsmuster von Progesteron ( P ), DOC ( D ) und 17-OH-Progesteron ( 17 ) in der 1. Chromatographie.  
Gel: Sephadex LH 20, Laufmittel: Dichlormethan : Methanol ( 98 : 2 )

Die Elutionsprofile von Progesteron und DOC sind mit Ausnahme der

Fractionen in den Randbezirken identisch ( Tab. 7 ); eine einzige 1 ml-Fraktion trennt die Elutionspeaks der beiden Steroide. Zwischen DOC und 17-OH-Progesteron kommt es zu vollständiger chromatographischer Trennung.

| Steroid           | Elutionsgrenzen ( ml ) | Elutionsvolumen ( ml ) |
|-------------------|------------------------|------------------------|
| Progesteron       | 18 - 23                | 20                     |
| DOC               | 19 - 25                | 21                     |
| 17-OH-Progesteron | 24 - 30                | 27                     |
| Androstendion     | 12 - 25                | 20                     |
| Testosteron       | 21 - 39                | 31                     |
| Corticosteron     | 28 - 36                | 32                     |
| Aldosteron        | 39 - 50                | 44                     |
| Cortison          | 43 - 57                | 48                     |
| Cortisol          | 69 - 90                | 80                     |

Tab. 7 : Elutionsgrenzen und Elutionsvolumina verschiedener Corticosteroide auf den Säulen der 1. Chromatographie.  
Gel: Sephadex LH 20, Laufmittel: Dichlormethan : Methanol  
98 : 2

Wie Tab. 7 außerdem zu entnehmen ist, können Androstendion und Testosteron in diesem Elutionssystem nur zum Teil von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron abgetrennt werden: Androstendion, das in Anbetracht der frühzeitigen Elution des Steroids ein relativ breites Elutionsprofil aufweist, wird zu etwa 50 % innerhalb der Elutionsgrenzen von Progesteron und DOC eluiert. Die Überlappungszone zwischen 17-OH-Progesteron und Testosteron umfaßt sechs Fraktionen, der Testosteron-Peak liegt außerhalb des Sammlungsbereichs von 17-OH-Progesteron. Das Elutionsprofil des Corticosterons überdeckt sich mit dem des 17-OH-Progesterons in zwei Randfraktionen ( Tab. 7 ). Die hochsubstituierten Steroidhormone folgen in großen Elutionsabständen ( Abb. 9 ).

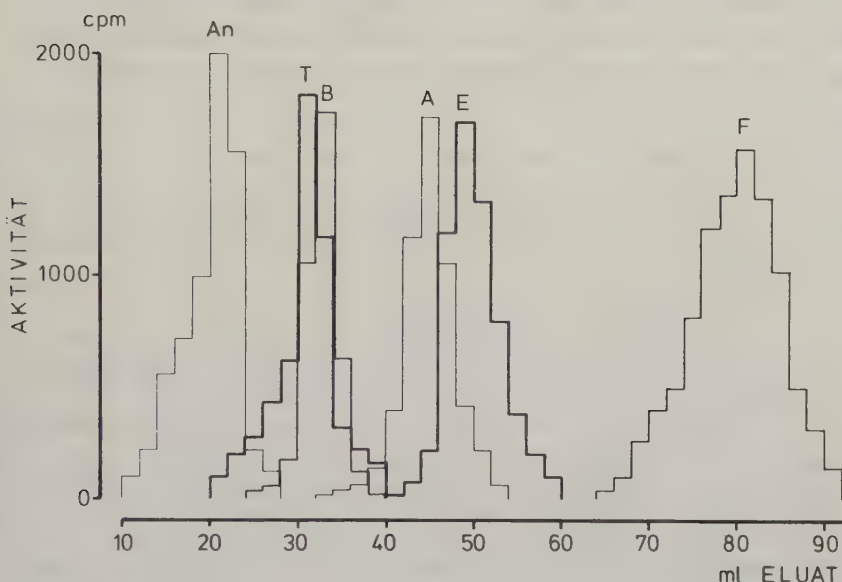


Abb. 9 : Typisches Elutionsmuster von Androstendion ( An ), Testosteron ( T ), Corticosteron ( B ), Aldosteron ( A ), Cortison ( E ) und Cortisol ( F ) auf den Säulen der 1. Chromatographie. Gel: Sephadex LH 20, Laufmittel: Dichlormethan : Methanol 98 : 2

Entsprechend diesem Steroidelutionsmuster sind in dem Eluat-"Pool", der zwischen den Fraktionen 15 und 30 gesammelt wird, Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron vollständig und ohne Verunreinigungen durch Corticosteroide, die zwei oder mehr Hydroxylgruppen besitzen, enthalten. Durch Elution eines Spülvolumens von 80 ml Laufmittel (Gesamtlaufmittelvolumen: 110 ml) werden sämtliche hochsubstituierten Steroidhormone einschließlich des Cortisols vollständig aus dem Gelbett entfernt. Die Säulen stehen danach für eine neuerliche

chromatographischen Reinigung von Probenextrakten zur Verfügung. Das für die 2. Chromatographie ( Gel: Sephadex LH 20; Laufmittel: Heptan : Chloroform : Äthanol : Wasser 50 : 50 : 0.25 : 0.02; Länge des Gelbetts: 37 cm ) typische Elutionsmuster von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron ist in Abb. 10 wiedergegeben.

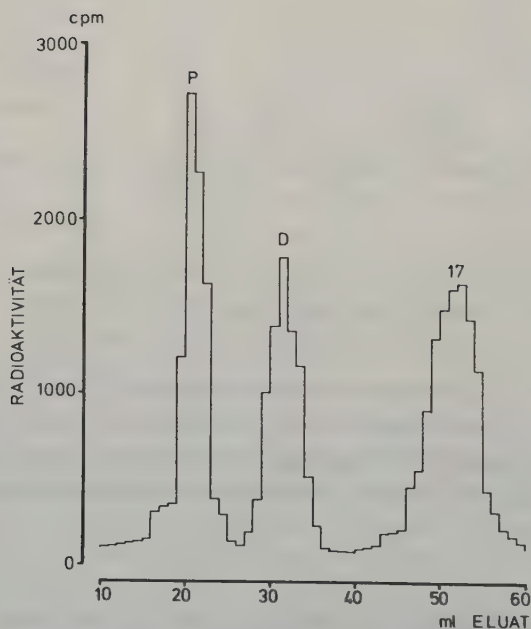


Abb. 10 : Typisches Elutionsmuster von Progesteron ( P ), DOC ( D ) und 17-OH-Progesteron ( 17 ) in der 2. Chromatographie. Gel: Sephadex LH 20, Laufmittel: Heptan : Chloroform : Äthanol : Wasser 50 : 50 : 0.25 : 0.02

Der DOC-Elutionspeak besitzt deutlichen Abstand ( 12 Fraktionen ) zum Progesteron-Peak, seine Distanz zum 17-OH-Progesteron-Peak ist gegenüber dem in der 1. Chromatographie erzielten Trennergebnis erheblich größer ( Tab. 8 ).

|                       | Elutions-<br>volumen ( ml ) | Fraktions-<br>nummern ( ml ) | Sammel-<br>marken ( ml ) | Volumen<br>( ml ) |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------|
| Progesteron           | 20                          | 17 - 24                      | 53 - 46                  | 7                 |
| DOC                   | 32                          | 27 - 35                      | 43 - 35                  | 8                 |
| 17-OH-<br>Progesteron | 53                          | 46 - 56                      | 24 - 14                  | 10                |
| Androstendion         | 21                          | 19 - 23                      | 51 - 47                  | 5                 |
| Testosteron           | 54                          | 50 - 59                      | 20 - 11                  | 10                |

Tab. 8 : Elutionsdaten von Progesteron, DOC, 17-OH-Progesteron, Androstendion und Testosteron auf den Säulen der 2. Chromatographie.

Gel: Sephadex LH 20, Laufmittel: Heptan : Chloroform :  
Äthanol : Wasser 50 : 50 : 0.25 : 0.02

Die Elutionsprofile der Hormone sind schmal und annähernd symmetrisch geformt. Erwartungsgemäß ist das Elutionsprofil von 17-OH-Progesteron infolge der längeren Elutionszeit breiter als das der rasch eluierten Hormone. Die drei Hormone werden in so großem Abstand voneinander eluiert, daß sich ihre Elutionsprofile nicht einmal in den einander zugekehrten Randbezirken überschneiden. Daher ist bei den Lokalisationsexperimenten mit den tritiierten Substanzen in den Intermediärfractionen zwischen den Hormonprofilen keine Aktivität meßbar. Die in der 1. Chromatographie beobachtete gleichzeitige Elution von Androstendion mit Progesteron und DOC und die Teilinterferenz von Testosteron und 17-OH-Progesteron kehren wieder ( Tab. 8 ). Spült man das Gelbett nach Elution des 17-OH-Progesterons mit 30 ml Laufmittel ( Gesamtvolumen

des Laufmittels: ca. 90 ml ), so wird damit Testosteron sicher entfernt. Die Säulen können sofort anschließend wieder beschickt werden.

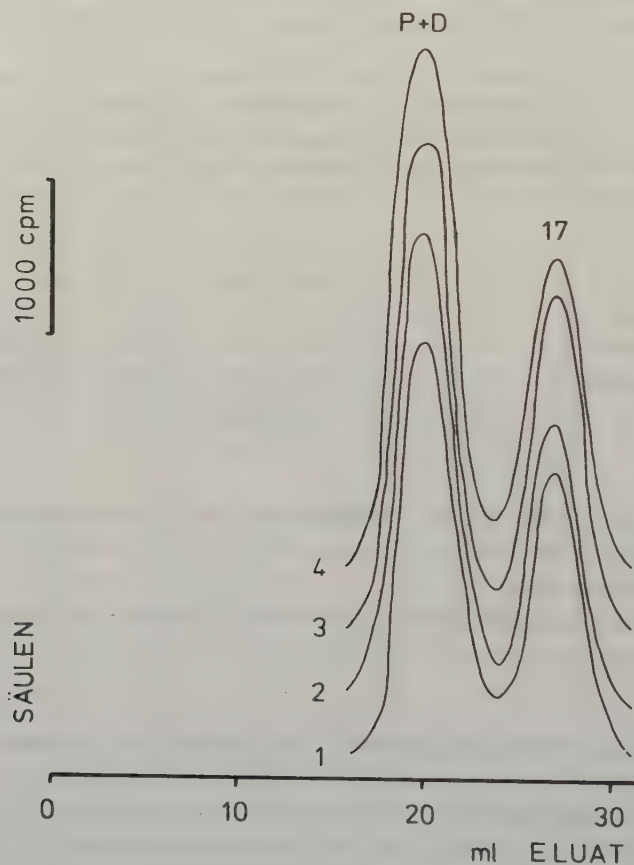


Abb.11 : Reproduzierbarkeit des Elutionsmusters der vereinigten Peaks von Progesteron ( P ) und DOC ( D ) sowie von 17-OH-Progesteron ( 17 ) auf verschiedenen Säulen der 1.Chromatographie. Gel: Sephadex LH 20, Laufmittel: Dichlormethan:Methanol 98:2 .

## Reproduktion der Lokalisation

Das Elutionsmuster von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron in der 1. Chromatographie läßt sich mit großer Zuverlässigkeit reproduzieren.

Abb.11 zeigt, daß für jedes der drei Hormone bei gleichzeitiger Elution auf vier verschiedenen Säulen der 1. Chromatographie zwischen den Elutionspeaks und -profilen fast vollständige Kongruenz besteht. Das Elutionsmuster ist über einen langen Zeitraum konstant, da sich auch bei häufiger Benützung der Säulen ( 15 - 20 Elutionen ) die Länge des Gelbetts und die Fließgeschwindigkeit des Laufmittels nicht verändern .

In Abb. 12 ist das Elutionsmuster von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron auf fünf, am Tage nach dem Packen parallel eluierten Säulen der 2. Chromatographie dargestellt .

Die Elutionspeaks und -profile der Hormone variieren zwischen den Säulen in sehr engen Grenzen. Die Trennschärfe der Elutionen ist nahezu identisch. Im Gegensatz zu den Säulen der 1.Chromatographie kommt es jedoch nach wiederholter Elution bei den Säulen der 2.Chromatographie zu einer geringen Verkürzung des Gelbetts. Nach sechs Chromatographien beträgt sie bei allen Säulen gleichmäßig ca. 2 cm . Die ursprüngliche Lokalisation von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron verschiebt sich aus diesem Grunde um zwei bis drei Fraktionen nach vorne ( Abb. 13 ) .

Obwohl gleichzeitig die Fließgeschwindigkeit des Laufmittels bei der Elution merklich zunimmt, bleiben Trennschärfe und Parallelität der Elutionsmuster auf allen Säulen erhalten. Als Ausgleich für die Gelbettverkürzung wird das Sammelmuster an das veränderte Elutionsmuster angepaßt. Das veränderte Sammelschema kann während weiterer sechs bis neun Chromatographien zuverlässig reproduziert werden. Nach 12 bis 15 Elutionen werden die Säulenfüllungen erneuert .

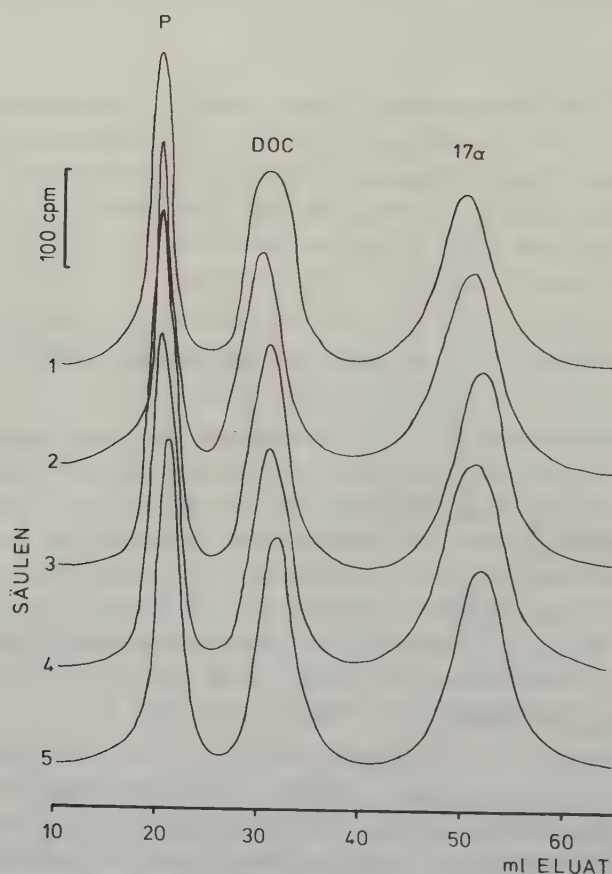


Abb.12 : Reproduzierbarkeit des Elutionsmusters von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron auf verschiedenen Säulen der 2.Chromatographie. Gel: Sephadex LH 20, Laufmittel: Heptan:Chloroform:Äthanol:Wasser 50:50:0.25:0.02 .

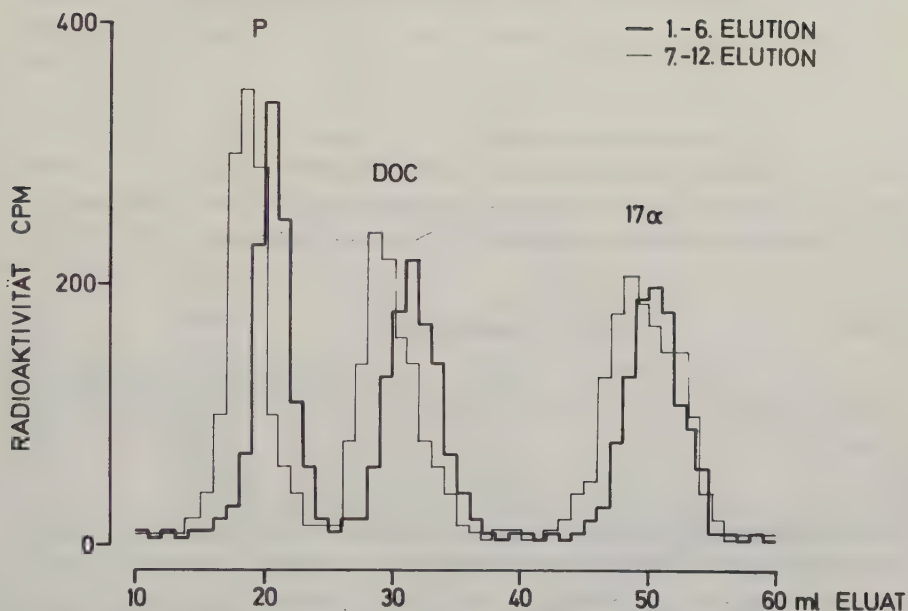


Abb.13 : Verschiebung des Elutionsmusters von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron auf den Säulen der 2.Chromatographie nach mehrmaliger Benützung der Säulen. Gel : Sephadex LH 20, Laufmittel: Heptan:Chloroform:Äthanol:Wasser 50:50:0.25:0.02 .

#### Wiederfindungen

Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten der ( tritierten ) Hormone nach Extraktion und 1.Chromatographie liegen im Bereich zwischen 80 und 85 % ( Tab.9 ) . Berücksichtigt man, daß durch die Extraktion bereits 10 % der ursprünglichen Substanzmenge verloren gehen, so entfällt auf die 1.Chromatographie ein Verlustanteil von nur 5 - 10 % der Ausgangsmenge.Nach Extraktion und doppelter chromatographischer Reinigung werden Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron zu 50-70 % wiedergefunden ( Tab.10 ) .

| Hormon            | Wiederfindungsrate (%) |
|-------------------|------------------------|
| Progesteron       | 85.9                   |
| DOC               | 84.4                   |
| 17-OH-Progesteron | 81.3                   |

Tab.9 : Wiederfindungsraten von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron nach Extraktion + 1.Chromatographie

| Hormon            | Wiederfindungsrate |       |      |                      |
|-------------------|--------------------|-------|------|----------------------|
|                   | MW(%)              | SD(%) | VK   | Variationsbreite (%) |
| Progesteron       | 68.2               | 8.1   | 11.9 | 47.5                 |
| DOC               | 55.4               | 13.8  | 24.9 | 56.3                 |
| 17-OH-Progesteron | 52.0               | 10.8  | 20.7 | 56.2                 |

Tab.10 : Wiederfindungsraten ( MW,SD,VK, Variationsbreite ) von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron nach Extraktion + 1.Chromatographie + 2.Chromatographie ( n = 204 )

In Tab.11 sind die Wiederfindungsraten der drei Hormone nach Säulen aufgeschlüsselt. Infolge der längeren Elutionszeiten liegen die Wiederfindungsraten von DOC und 17-OH-Progesteron eindeutig niedriger als die von Progesteron. Das relativ hohe Wiederfindungsdefizit in der 2.Chromatographie ( 25 - 30 % für DOC und 17-OH-Progesteron ) findet eine zusätzliche Erklärung in der Tatsache, daß vom Elutionsprofil der Steroide jeweils nur die Fraktionen mit hohem Substanzgehalt gesammelt, die substanzarmen Randfraktionen hingegen verworfen werden, damit man möglichst reines Material erhält. Für die anschließende radioimmunologische Messung reichen die Mengen der nach den Reinigungsschritten wiedergefundenen Steroide bei weitem aus.

Die Verschiebungen im Elutionsmuster der Säulen nach mehreren Chromatographien führen zu einer Senkung der Wiederfindungsraten,

solange das Sammelschema nicht korrigiert wird. Nach der Korrektur werden wieder die früheren Wiederfindungsergebnisse erzielt. Aus diesen Schwankungen der Einzelwiederfindungen resultiert die große Variationsbreite der durchschnittlichen Wiederfindungsraten ( Tab.10 ).

| Hormon      |     | 1.Säule<br>(n=34) | 2.Säule<br>(n=34) | 3.Säule<br>(n=34) | 4.Säule<br>(n=34) | 5.Säule<br>(n=34) | 6.Säule<br>(n=34) |
|-------------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Progesteron | MW  | 68.2              | 68.3              | 68.8              | 68.2              | 65.8              | 69.9              |
|             | +SD | 6.9               | 6.6               | 8.3               | 6.8               | 11.1              | 8.3               |
|             | VK  | 10.2              | 9.6               | 12.1              | 10.0              | 16.8              | 11.8              |
| DOC         | MW  | 55.7              | 54.3              | 54.9              | 52.3              | 56.0              | 59.2              |
|             | +SD | 15.7              | 14.5              | 14.9              | 12.6              | 13.3              | 11.2              |
|             | VK  | 28.2              | 26.7              | 27.1              | 24.1              | 23.7              | 18.9              |
| 17-OH-      | MW  | 51.2              | 49.6              | 52.6              | 47.5              | 54.3              | 58.1              |
| Progesteron | +SD | 10.5              | 9.5               | 10.6              | 10.6              | 10.9              | 9.9               |
|             | VK  | 20.5              | 19.2              | 20.1              | 22.3              | 20.0              | 17.1              |

Tab.11 : Wiederfindungsraten ( MW, SD, VK ) von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron nach Extraktion + 1.Chromatographie + 2.Chromatographie, nach Säulen aufgeschlüsselt

## Praxis

Sowohl in der 1. als in der 2.Chromatographie werden sechs Säulen parallel eluiert. Die Säulen müssen jedoch nicht zur gleichen Zeit gestartet werden, da jede Elution unabhängig von den Elutionen auf den Nachbarsäulen durch die Graduierung der Sammelgläser in der 1. bzw. die Kalibrierung der Vorratsgefäße in der 2.Chromatographie überwacht und gesteuert wird. Bei der 1.Chromatographie betragen die Startabstände im allgemeinen eine, bei der

2.Chromatographie zwei bis drei Minuten. Wegen des niedrigen Elutionsflows ( ca.30 ml/h ) ist das Laufmittelvolumen, das während des Starts die Säule verläßt, sehr gering ( ca.0.5 ml ) und infolge des standardisierten Probentransfers zudem für alle Säulen identisch, so daß die Qualität der Reproduktion des Elutions - musters dadurch nicht beeinträchtigt wird. Da der kontrollbedürftige Teil der 1.Chromatographie bereits nach einer Stunde beendet ist und die Säulen dann nur noch nachgespült werden, wird währenddessen die 2.Chromatographie durchgeführt. Beide Chromatographien enden ungefähr gleichzeitig nach insgesamt vier Stunden.Es ist daher möglich, an einem Arbeitstag insgesamt zwei Mal je sechs Plasmaproben zu chromatographieren.

Wenn die Säulen nicht in Betrieb sind, werden sie mit einem Glasstopfen ( mit PTFE-Manschette ) verschlossen. Das Gelbett ist dadurch ausreichend vor Austrocknung geschützt. Zusätzlichen Schutz bietet bei den Säulen der 2.Chromatographie ein Überstand von 2 - 3 ml des ( spezifisch leichteren ) Laufmittels, der über dem Gelbett belassen wird. Bei den Säulen für die 1.Chromatographie ist diese Schutzmaßnahme nicht möglich, da das Laufmittel wegen seines größeren spez. Gewichts rasch zur Fritte absinkt. Außer - dem wäre damit eine unerwünschte Auflockerung der Gelpackung verbunden .

### 3.1.3. ERGEBNISSE DER ARBEITSWEISE BEIM RADIOIMMUNOASSAY

#### Die Standardkurven

Typische RIA-Standardkurven für den Meßbereich von 0 bis 500 pg Progesteron und 17-OH-Progesteron bzw. von 0 bis 400 pg DOC sind in den Abb. 14, 15 und 16 wiedergegeben. Daneben sind die steilen Bereiche der Standardkurven ( zwischen 0 und 100 pg ), wie man sie bei Einsätzen von 20, 40, 50, 80 und 100 pg des stummen Steroids erhält, vergrößert herausgezeichnet. Die Aktivität des markierten Steroids im Standard ( Leerwert ) entspricht mit ca.

6000 cpm einer Konzentration von  $8.2 \times 10^{-10}$  Mol/l Progesteron bzw.  $7.8 \times 10^{-10}$  Mol/l DOC und 17-OH-Progesteron. Der Anteil der Gesamt-Tracersubstanz, der bei Abwesenheit eines Antikörpers infolge unspezifischer Bindungskräfte des Inkubationsmediums von der Dextran-Kohle-Suspension nicht adsorbiert werden kann, liegt mit 1.5 % ( n=4 ) im Sollbereich von zwischen 0.5 und 2.5 % .

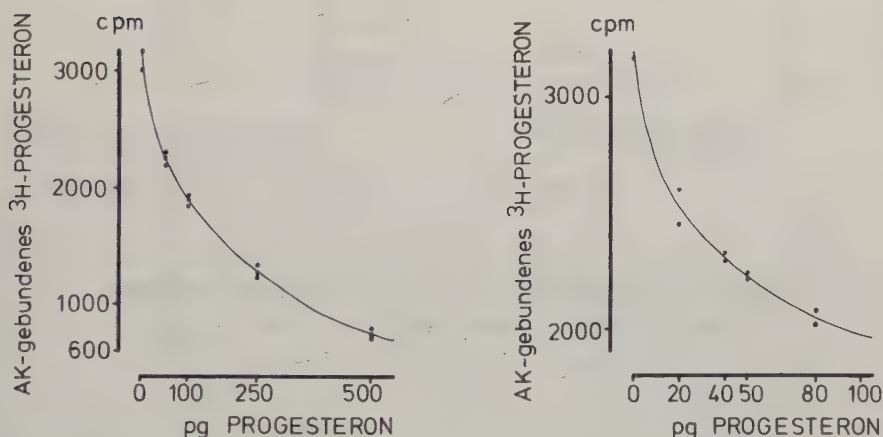


Abb.14 : Progesteron-RIA Standardkurve 0 - 500 pg und Standardkurve 0 - 100 pg. AK-Biolab, verdünnt nach Vorschrift

Aufschluß über den Schwankungsbereich der Nullwertbindung, d.h. den Prozentanteil der Leerwert-Aktivität des bei Abwesenheit stummen Antigens von der Antikörper-Verdünnung gebundenen markierten Antigens, in einer Reihe von neun aufeinanderfolgenden Radioimmunoassays für Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron gibt Abb. 17. Mit 6 % bei Progesteron und je 7 % bei DOC und 17-OH-Progesteron ist die Streubreite der Nullwertbindung zwar in allen drei Radioimmunoassays relativ hoch, doch eine

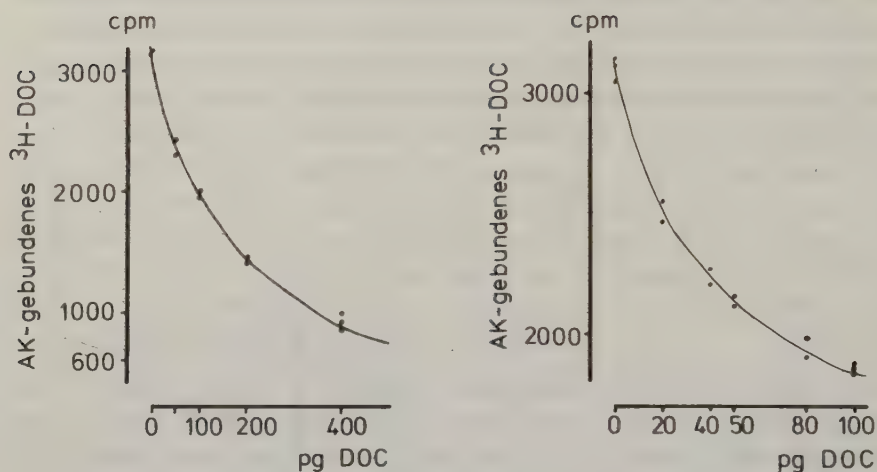


Abb.15 : DOC-RIA Standardkurve 0 - 400 pg und Standardkurve 0 - 100 pg. AK 24, Verdünnung: 1:11 500

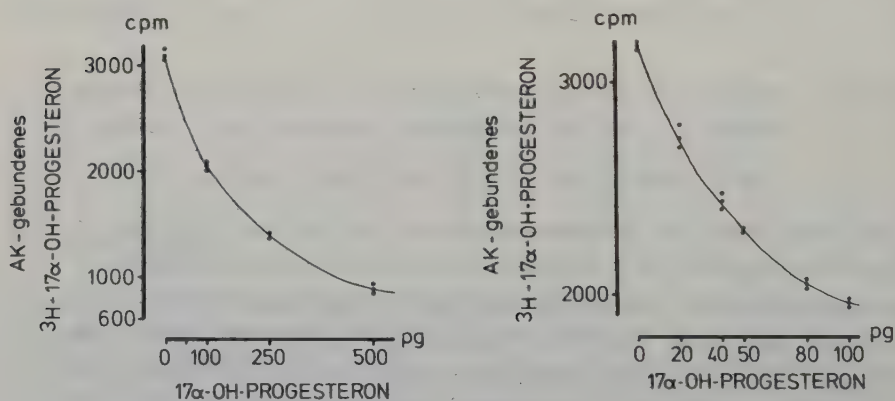


Abb.16 : 17-OH-Progesteron-RIA Standardkurve 0 - 500 pg und Standardkurve 0 - 100 pg. AK 140, Verdünnung: 1:12 000

Tendenz, die auf Veränderungen der Eigenschaften ( Reinheit, Affinität, Bindungskapazität ) des Antikörpers oder methodische Systemfehler ( z.B. bei der Gleichgewichtseinstellung zwischen den Reaktionspartnern oder der Trennung von freiem und gebundenem Antigen ) hinwiese, ist nicht erkennbar.

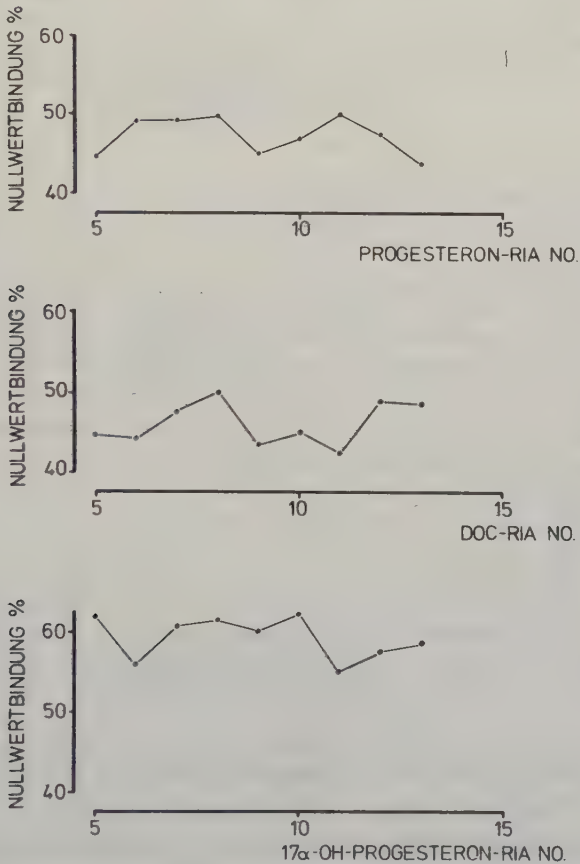


Abb.17 : Schwankungen der Nullwertbindung ( des  $^3\text{H}$ -Steroids an den Antikörper bei Abwesenheit von stummem Antigen ) innerhalb einer Reihe (  $n=9$  ) von Radioimmunoassays für Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron

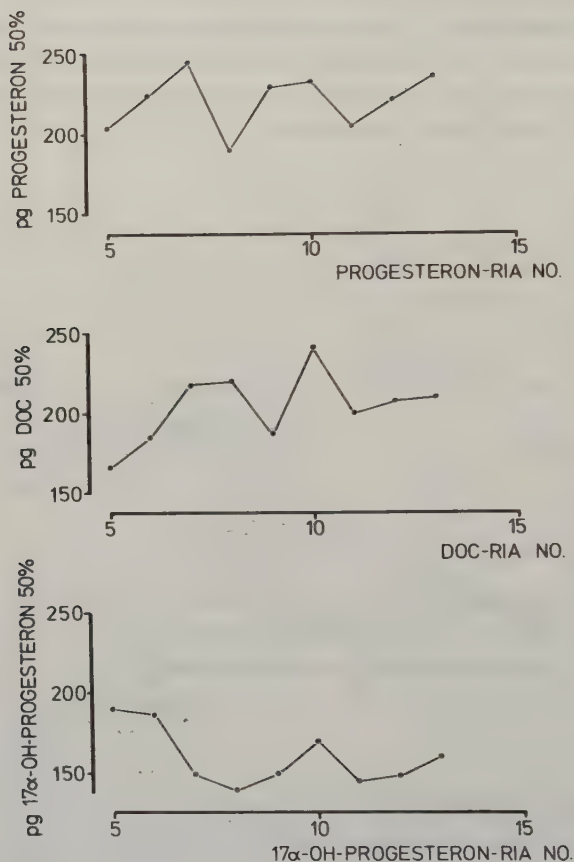


Abb.18 : Schwankungen der Steroidmengen, die 50 % des AK-gebundenen Tracersteroids ( des Nullwerts ) von den Bindungsstellen am AK verdrängen, innerhalb einer Reihe ( n=9 ) von RIA für Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron

Ebenso fehlen in der gleichen Reihe von Radioimmunoassays tendenzielle Veränderungen innerhalb der Schwankungen der stummen Steroidmengen, die 50 % des AK-gebundenen Tracersteroids des Nullwerts von den Bindungsstellen am Antikörper verdrängen ( Streuungsbreite beim Progesteron-RIA: 60 pg, beim DOC-RIA: 70 pg, beim 17-OH-Progesteron-RIA: 50 pg, Abb.18 )

| n = 9<br><br>$^3\text{H}$ -Progesteron<br>% gebunden<br><br>Bereich:<br>MW $\pm$ SD:           | Kaltes Progesteron       |                 |                 |                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                                                                                | 50 pg                    | 100 pg          | 250 pg          | 500 pg          |
|                                                                                                | 81.4-73.9                | 68.6-57.8       | 49.4-43.6       | 33.3-27.8       |
|                                                                                                | 77.6 $\pm$ 2.21          | 63.5 $\pm$ 3.51 | 45.9 $\pm$ 1.80 | 30.9 $\pm$ 1.82 |
| Beim Nullwert ( 0 pg kaltes Progesteron ) : 100 %                                              |                          |                 |                 |                 |
| n = 9<br><br>$^3\text{H}$ -DOC<br>% gebunden<br><br>Bereich:<br>MW $\pm$ SD:                   | Kaltes DOC               |                 |                 |                 |
|                                                                                                | 50 pg                    | 100 pg          | 200 pg          | 400 pg          |
|                                                                                                | 84.5-72.6                | 68.3-59.6       | 52.6-47.4       | 36.7-32.8       |
|                                                                                                | 77.8 $\pm$ 4.54          | 64.1 $\pm$ 2.99 | 50.2 $\pm$ 2.15 | 35.2 $\pm$ 1.31 |
| Beim Nullwert ( 0 pg kaltes DOC ) : 100 %                                                      |                          |                 |                 |                 |
| n = 9<br><br>$^3\text{H}$ -17-OH-<br>Progesteron<br>% gebunden<br><br>Bereich:<br>MW $\pm$ SD: | Kaltes 17-OH-Progesteron |                 |                 |                 |
|                                                                                                | 50 pg                    | 100 pg          | 250 pg          | 500 pg          |
|                                                                                                | 75.0-67.9                | 60.3-53.5       | 41.0-35.3       | 26.7-21.2       |
|                                                                                                | 72.3 $\pm$ 2.15          | 57.5 $\pm$ 2.36 | 37.5 $\pm$ 2.03 | 23.7 $\pm$ 1.65 |
| Beim Nullwert ( 0 pg kaltes 17-OH-Progesteron ) : 100 %                                        |                          |                 |                 |                 |

Tab.12 : Bindungsverhältnisse der Tracersubstanzen in den RIA-Standardkurven von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron. Der Prozentanteil des AK-gebundenen  $^3\text{H}$ -Steroids bei den verschiedenen Werten der Eichreihe am totalen gebundenen  $^3\text{H}$ -Steroid ( beim Nullwert ) ist ein exaktes Maß für die Steilheit in den verschiedenen Abschnitten der Eichkurve .

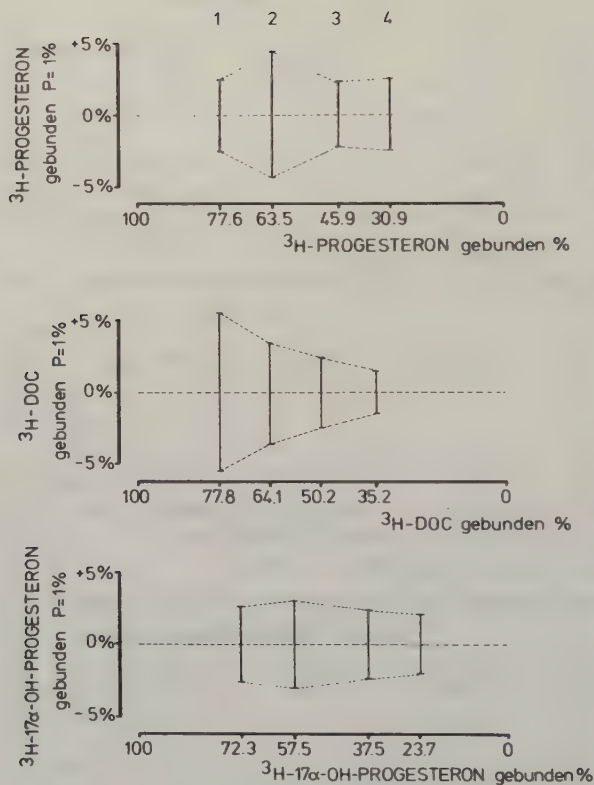


Abb.19 : Vertrauensbereiche ( 99 % ) für den Prozentanteil des gebundenen  $^3\text{H}$ -Steroids ( beim Nullwert: 100 % ) an den verschiedenen Punkten der RIA-Standardkurven: 50, 100, 200 bzw.250, 400 bzw. 500 pg. Vergleiche Tab. 12

Tab.12 und die zugehörige Abb.19 stellen in differenzierter Form die prozentualen Anteile des AK-gebundenen Tracers am totalen gebundenen Tracer ( Nullwert ) bei den verschiedenen Eichreihenwerten dar und erlauben damit eine quantitative Erfassung der Steilheit in den verschiedenen Abschnitten der Standardkurve .

Während sich im Bereich zwischen 0 und 100 pg die Bindungsverhältnisse der drei RIA-Standardkurven recht ähnlich sind, divergieren sie bei den höheren Eichreihenwerten. Im 17-OH-Progesteron-RIA werden bereits durch etwa 250 pg stummen Antigens 2 / 3 der gebundenen Tracersubstanz des Nullwerts vom Antikörper verdrängt, während im DOC-Assay dazu ca. 400 pg und im Progesteron-Assay ca. 500 pg des kalten Steroids benötigt werden. Im Hauptmeßbereich der Standardkurven zwischen 50 und 250 pg ( korrespondierende Plasmakonzentrationen : 1 bzw. 5 ng/ml ) ist also für die 17-OH-Progesteron-Messungen mit einer insgesamt etwas höheren Reproduzierbarkeit ( Abb. 19 ) zu rechnen als für die Bestimmungen von Progesteron und DOC ( vgl. 3.1.3. Abschnitt: Reproduzierbarkeit ). Im 17-OH-Progesteron-RIA bestehen zwischen den Vertrauensbereichen für den Prozentanteil des AK-gebundenen Tracers ( von der Tracermenge des Nullwerts ) in den verschiedenen Eichkurvenabschnitten fast keine Unterschiede, sämtliche Eichwerte sind also gut reproduzierbar; dagegen ist im Progesteron-Assay beim Eichwert 100 pg und im DOC-Assay beim Eichwert 50 pg mit der relativ geringsten Reproduzierbarkeit zu rechnen.

Beispiele für RIA-Regressionsgeraden zeigt Abb. 20 .

Da es sich bei den RIA-Eichwerten um ungruppierte Stichproben handelt, bei denen ein exakter Test der Linearität der Regressionsfunktion nicht möglich ist, wird die Linearitätsprüfung an Hand der graphischen Darstellungen " von bloßem Auge " ( 16 ) durchgeführt. Die Abweichungen der abhängigen Variablen  $y$  von der Regressionsgerade machen stets einen durchaus zufälligen Eindruck. Die Korrelationskoeffizienten der RIA-Regressionsgeraden liegen ausnahmslos über 0.9000 und damit bei dem konstanten Stichprobenumfang 5 deutlich über dem Signifikanzniveau von 5 % (  $r = 0.8783$  ) .

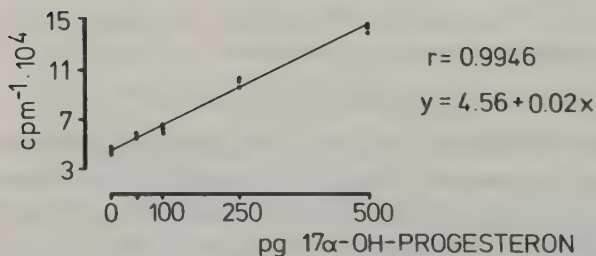
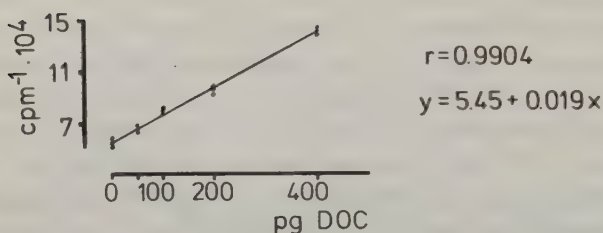
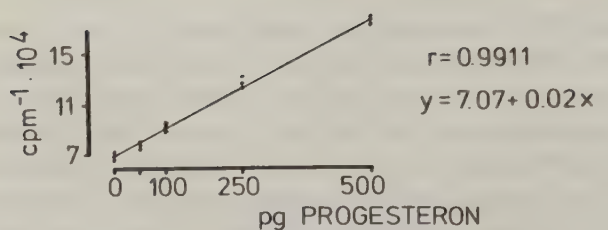


Abb.20 : Regressionsgeraden ( x-Achse: pg Steroid ; y-Achse:  $\text{cpm}^{-1}$  ) typischer Standardkurven von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron

### Die Spezifität

Die Kreuzreaktionen der in den Radioimmunoassays verwendeten Antikörper gegen Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron mit den wichtigsten Corticosteroiden sowie Vertretern der gonadalen Steroidhormone sind in Tab. 13 aufgeführt .

| Hormon            | <u>Anti-Prog.</u><br>(C3-Konj.)<br>Antikörper<br>Biolab | <u>Anti-DOC</u><br>(C21-Konj.)<br>Antikörper<br>AK 24 | <u>Anti-17OH-P.</u><br>(C3-Konj.)<br>Antikörper<br>AK 140 |
|-------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Progesteron       | 100.00                                                  | 54.30                                                 | 12.10                                                     |
| DOC               | 1.70                                                    | 100.00                                                | 0.11                                                      |
| 17-OH-Progesteron | 0.12                                                    | 1.90                                                  | 100.00                                                    |
| Androstendion     | 0.10                                                    | 4.20                                                  | 0.10                                                      |
| Testosteron       | 0.10                                                    | 8.30                                                  | 0.10                                                      |
| Corticosteron     | 0.15                                                    | 3.40                                                  | 0.10                                                      |
| Aldosteron        | 0.01                                                    | 0.27                                                  | 0.10                                                      |
| Cortison          | 0.01                                                    | 0.10                                                  | 0.10                                                      |
| Cortisol          | 0.01                                                    | 0.10                                                  | 0.10                                                      |
| Östradiol         | 0.01                                                    | 0.01                                                  | 0.01                                                      |

Tab.13 : Kreuzreaktionen ( % ) der in den Radioimmunoassays verwendeten Steroid-Antikörper mit den wichtigsten Corticosteroiden und Vertretern der gonadalen Steroidhormone

Die Kreuzreaktionen des gegen ein C3 - Proteinkonjugat gebildeten Kaninchen-Anti-Progesteron-Antikörpers mit den chemisch nahe stehenden Steroiden DOC und 17-OH-Progesteron sind bemerkenswert niedrig. Die Affinität des Antikörpers zu den C19 - Steroiden Androstendion und Testosteron ist erwartungsgemäß mit weniger als 1 / 1000 der Affinität zu Progesteron äußerst gering ( Abb.21 ).

Der gegen ein C21 - Proteinkonjugat gebildete Schaf-Anti-DOC-Antikörper weist ein relativ breitgefächertes Spektrum von Kreuzreaktionen auf. Quantitativ bei weitem am bedeutsamsten ist diejenige mit Progesteron ( 54.3 % ), doch auch diejenigen mit 17-OH-Progesteron ( 1.90 % ) und Corticosteron ( 3.40 % ) müssen beachtet werden. Außerdem besteht eine bemerkenswerte Affinität

des Antikörpers zu den androgen wirksamen C19 - Steroiden (Abb.22). Auffälligstes Merkmal der Kreuzreaktivität des gegen ein C3 - Proteinkonjugat gebildeten Kaninchen-Anti-17-OH-Progesteron-Antikörpers ist die im Vergleich zu der mit dem C21 - Steroid DOC ( 0.11 % ) hohe Kreuzreaktion mit Progesteron ( 12.1 % ), das keine Hydroxylgruppe am Sterangerüst besitzt. Die Kreuzreaktionen mit den höhersubstituierten Corticosteroiden und auch mit den Androgenen sind vernachlässigbar klein ( Abb.23 ).

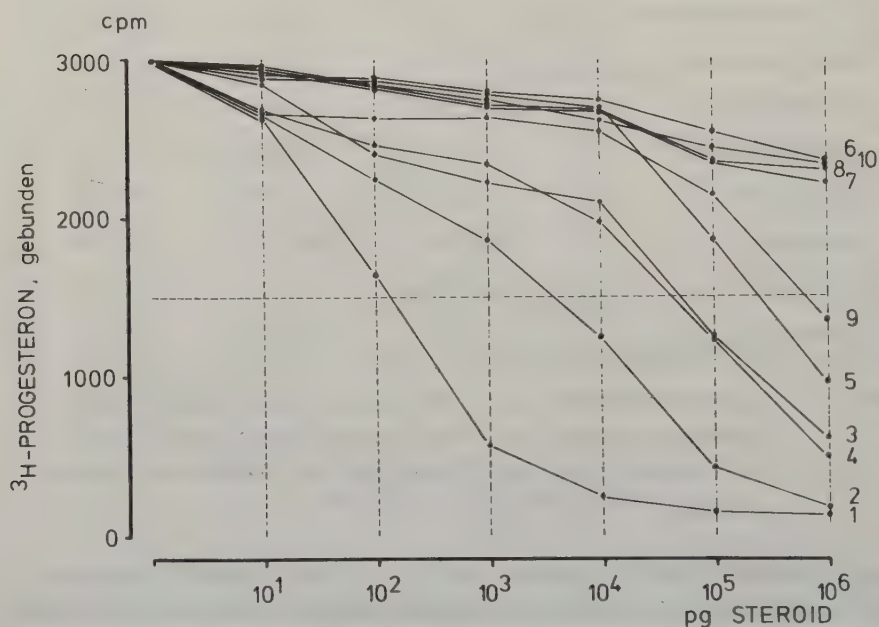


Abb.21 : Graphische Darstellung der Kreuzreaktionen des Anti-Progesteron-Antikörpers Biolab  
( 1=Progesteron; 2=DOC; 3=17-OH-Progesteron; 4=Corticosteron; 5=Testosteron; 6=Aldosteron; 7=Cortison ; 8=Cortisol; 9=Androstendion; 10=Östradiol )

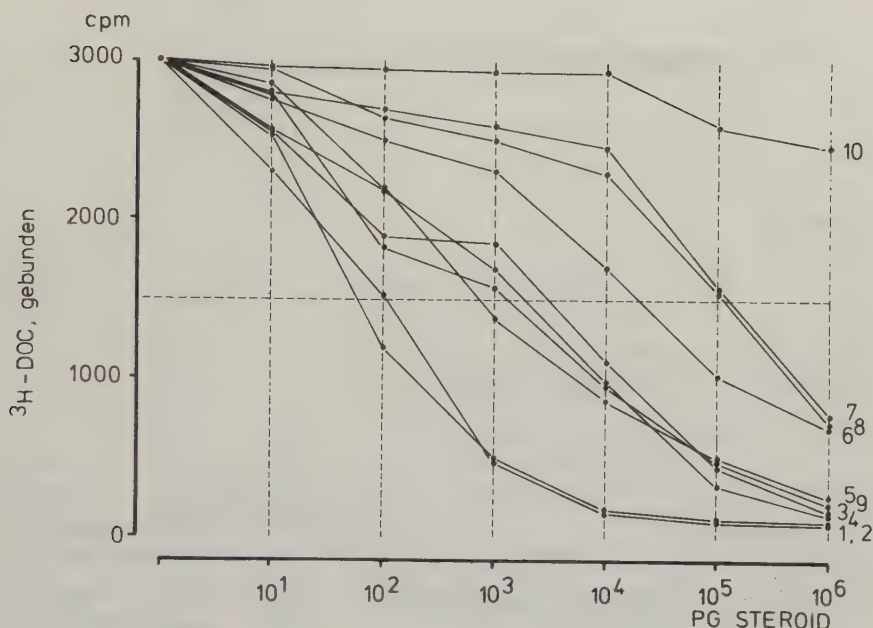


Abb.22 : Graphische Darstellung der Kreuzreaktionen des Anti-DOC-Antikörpers 24

( 1=Progesteron; 2=DOC; 3=17-OH-Progesteron; 4=Corticosteron; 5=Testosteron; 6=Aldosteron; 7=Cortison; 8=Cortisol; 9=Androstendion; 10=Östradiol )

### Die Sensitivität

Die Sensitivitätsuntergrenze der Standardkurven von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron liegt einheitlich im Bereich zwischen 0 und 20 pg. Aus jeweils neun Standardkurven werden folgende  $\text{MW} \pm 2 \text{ SD}$  für den Nullwert der Standardkurven erhalten :  $1.5 \pm 4.2$  pg Progesteron,  $0.4 \pm 5.2$  pg DOC,  $0.7 \pm 4.6$  pg 17-OH-Progesteron. Die entsprechenden Werte für den Eichpunkt 20 pg betragen :  $19.4 \pm 5.9$  pg Progesteron,  $21.2 \pm 14.0$  pg DOC,  $22.2 \pm 7.8$  pg 17-OH-Progesteron. Zwischen den 95 % - Vertrauensbereichen der Eichwerte 0 und 20 pg besteht demnach bei keiner Standardkurve

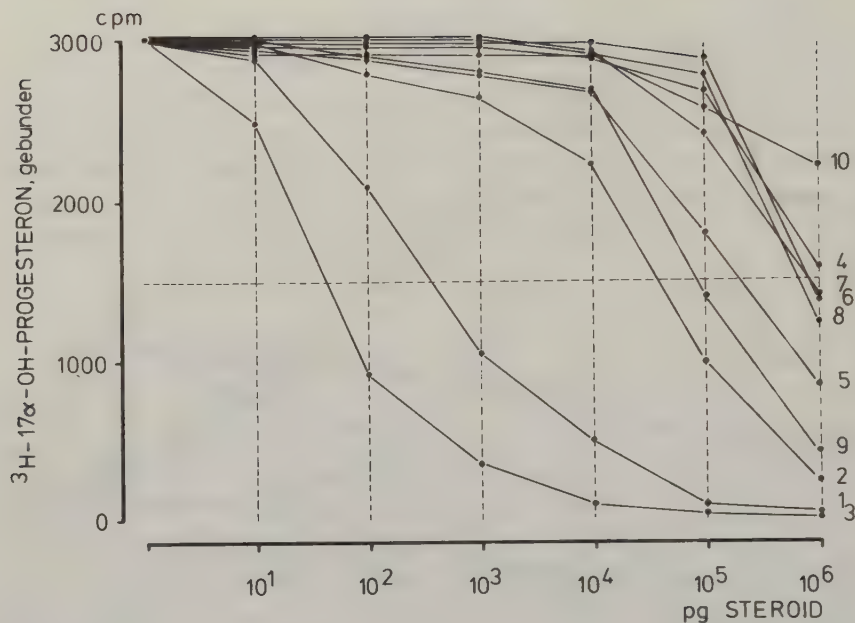


Abb.23 : Graphische Darstellung der Kreuzreaktionen des Anti-17-OH-Progesteron-Antikörpers 140  
( 1=Progesteron; 2=DOC; 3=17-OH-Progesteron; 4=Corticosteron; 5=Testosteron; 6=Aldosteron; 7=Cortison; 8=Cortisol; 9=Androstendion; 10=Östradiol )

eine Überlappungszone. Die Wahrscheinlichkeit von Nullwertbestimmungen, die in den Vertrauensbereich des Eichwerts 20 pg fallen, liegt bei 5 %. Bezieht man die eingesetzte Menge des Untersuchungsmaterials, mittlere Wiederfindungsraten und die Teilungsfaktoren mit in die Berechnungen ein, so ergeben sich als Sensitivitätsuntergrenze der radioimmunologischen Bestimmungen von Progesteron 0.07 ng / ml, von DOC 0.10 ng / ml und von 17-OH-Progesteron 0.09 ng / ml .

Die Ergebnisse der Testung der Antikörper-Titer für den DOC- und 17-OH-Progesteron-RIA sind in Abb.24 graphisch dargestellt.

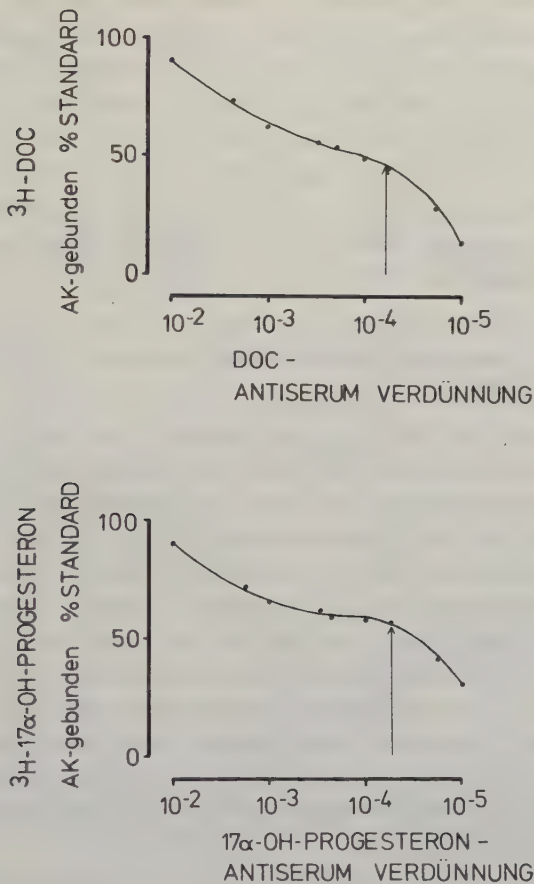


Abb.24 : Testung der Antikörper-Titer ( oben: DOC-Antikörper, unten: 17-OH-Progesteron-Antikörper ). Die Assay-Aliquots der optimalen Antikörper-Verdünnungen binden ca.50 % der Standardtracersubstanz ( 6000 cpm ).Titer des DOC-Antikörpers 1:11 500, Titer des 17-OH-Progesteron-Antikörpers 1:12 000 .

Im DOC-RIA wird eine Verdünnung des Antiserums mit Puffer " C " im Verhältnis 1:11 500, im 17-OH-Progesteron-RIA eine Antiserum-Verdünnung mit Puffer " C " im Verhältnis 1:12 000 eingesetzt .

Das lyophilisierte Progesteron-Antiserum wird nach Angaben der Lieferfirma verdünnt. Das in den RIA verwendete Volumenaliquot von 0.500 ml der Verdünnung bindet ca. 50 % der markierten Substanz des Leerwerts ( 6000 cpm ), wenn die Inkubation der Bindungspartner in insgesamt 0.600 ml Puffer " C " eine Stunde bei 37° C und anschließend zwei Stunden bei 0 - 4° C stattfindet und die Trennung von freiem und gebundenem Steroidantigen mit einer Dextran-Kohle-Suspension unter standardisierten experimentellen Bedingungen durchgeführt wird.

Zur Prüfung der Homogenität der Antikörper dienen die SCATCHARD-Plots, zur Ermittlung der Assoziationskonstanten  $K_a$  die MICHAELIS-MENTEN-Diagramme der Abb. 25.

In den SCATCHARD-Plots des Anti-Progesteron- und des Anti-17-OH-Progesteron-Antikörpers sind deutlich ein steiler und ein flacher Kurvenabschnitt zu unterscheiden. Dieses typische Verhalten weist auf die Existenz von Antikörperpopulationen sowohl mit hoher als auch mit niedriger Affinität zum Antigen in den Antisera hin. Im Gegensatz dazu steht die relativ konstante Neigung des SCATCHARD-Plots für das DOC-Antiserum, aus der zu schließen ist, daß das Antiserum eine recht homogene AK-Population besitzt. Die Assoziationskonstante des DOC-Antikörpers liegt daher auch mit  $3.12 \times 10^9$  l / Mol über den  $K_a$  der Antikörper gegen Progesteron und 17-OH-Progesteron (  $2 \times 10^9$  bzw.  $1.45 \times 10^9$  l / Mol ), die eine heterogene Population in ihren durchschnittlichen Bindungseigenschaften charakterisieren.

Der Methode n - Blank des hier geschilderten Meßverfahrens setzt sich aus zwei Komponenten, dem Chromatographie-Blank und dem Assay-Blank zusammen. Der Chromatographie-Blank ist durch den Zusatz steroidfreien Säuleneluats zu den Eichansätzen weitgehend eliminiert. Der Assay-Blank wird regelmäßig mit 1 ml - Einsätzen von destilliertem Wasser oder Puffer " C ", die die gesamte Meßprozedur durchlaufen, geprüft. Zur Kontrolle des Plasma - Blanks werden 0.250 ml - Aliquots steroidfreien ( durch fünffache Extraktion mit Diäthyläther ) Plasmas verwendet. Der Großteil dieser Blankbestimmungen ist null; zwischen den Werten für Assay-Blanks und Plasma-Blanks lassen sich keine Unterschiede feststellen. Als Blank-MW  $\pm$  SD pro RIA-Röhrchen ergeben sich im Progesteron-

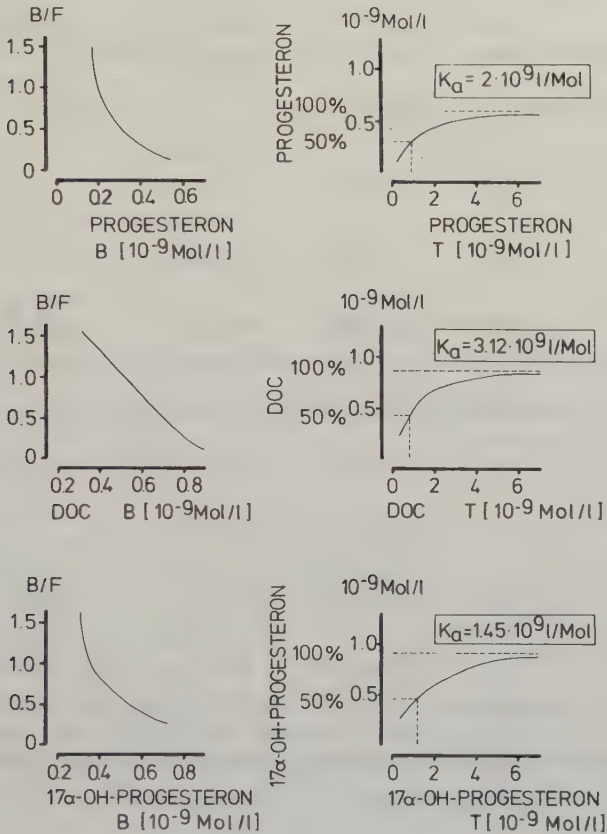


Abb.25 : Prüfung der in den RIA verwendeten Antikörper gegen Progesteron( Biolab ), gegen DOC ( AK 24 ) und gegen 17-OH- Progesteron ( AK 140 ) :

Links: SCATCHARD-Plot zur Prüfung der Homogenität des Antiserums

Rechts: MICHAELIS-MENTEN-Diagramm zur Berechnung der Assoziationskonstante  $K_a$  des Antikörpers

T : Gesamtsteroid, B : Gebundenes Steroid, F : Freies Steroid

| P R O G E S T E R O N ( ng / ml )             |      |            |          |             |
|-----------------------------------------------|------|------------|----------|-------------|
|                                               | MW   | SD         | VK ( % ) | BEREICH     |
| ASSAY 1<br>(n=12)                             | 1.79 | $\pm 0.19$ | 11.00    | 1.55 - 2.26 |
| ASSAY 2<br>(n=12)                             | 1.77 | $\pm 0.19$ | 10.80    | 1.52 - 2.10 |
| ASSAY 3<br>(n= 9)                             | 1.88 | $\pm 0.30$ | 15.98    | 1.37 - 2.14 |
| ASSAYS 1-3<br>(n=33)                          | 1.78 | $\pm 0.26$ | 14.35    | 1.37 - 2.26 |
| D O C ( ng / ml )                             |      |            |          |             |
| ASSAY 1<br>(n= 9)                             | 1.13 | $\pm 0.12$ | 11.19    | 0.98 - 1.40 |
| ASSAY 2<br>(n= 9)                             | 1.33 | $\pm 0.17$ | 13.18    | 1.14 - 1.63 |
| ASSAY 3<br>(n= 9)                             | 1.11 | $\pm 0.14$ | 13.14    | 0.89 - 1.30 |
| ASSAYS 1-3<br>(n=27)                          | 1.17 | $\pm 0.17$ | 14.43    | 0.89 - 1.63 |
| 1 7 - O H - P R O G E S T E R O N ( ng / ml ) |      |            |          |             |
| ASSAY 1<br>(n=12)                             | 1.56 | $\pm 0.11$ | 6.88     | 1.45 - 1.77 |
| ASSAY 2<br>(n=11)                             | 1.31 | $\pm 0.12$ | 8.94     | 1.02 - 1.41 |
| ASSAY 3<br>(n=11)                             | 1.65 | $\pm 0.12$ | 7.61     | 1.48 - 1.96 |
| Assays 1-3<br>(n=34)                          | 1.51 | $\pm 0.18$ | 12.34    | 1.02 - 1.96 |

Tab.14 : Reproduzierbarkeit der Steroid-Radioimmunoassays. Untersuchungsmaterial: Plasma - " Pool " männlicher Erwachsener , angereichert mit je 1.0 ng / ml Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron

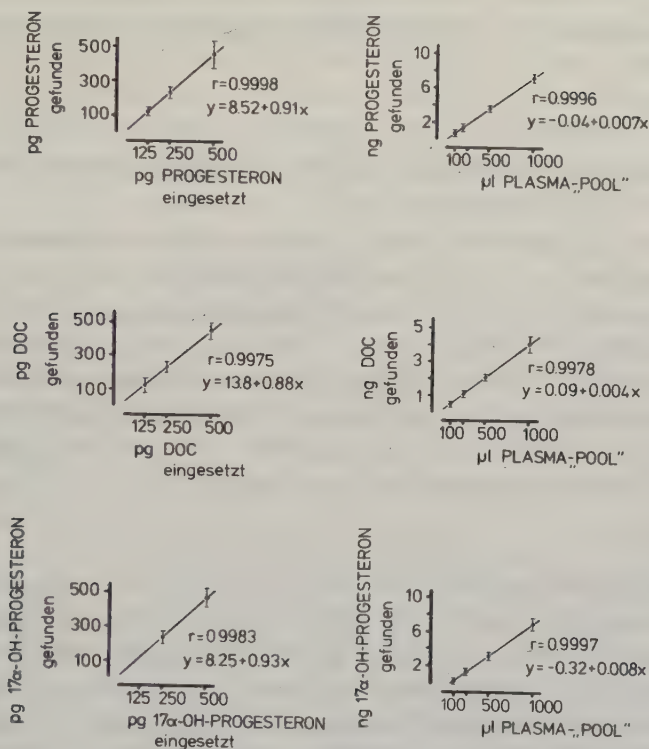


Abb.26 : Richtigkeit der Steroid-Radioimmunoassays. Links: Wiederfindungstest, rechts: Parallelitätstest

ron-RIA aus neun Bestimmungen ( 7 null, 2 positiv )  $3.6 \pm 8.6$  pg, im DOC-RIA aus neun Bestimmungen ( 7 null, 2 positiv )  $3.4 \pm 6.8$  pg und im 17-OH-Progesteron-RIA aus neun Bestimmungen ( 5 null, 4 positiv )  $3.9 \pm 6.4$  pg. Berücksichtigt man zusätzlich Teilungsfaktoren und prozedurale Verluste, dann errechnen sich die folgenden Blankmittelwerte  $\pm$  Standardabweichung :  $0.07 \pm 0.18$  ng / ml im Progesteron-RIA,  $0.06 \pm 0.13$  ng / ml im DOC-RIA und

$0.08 \pm 0.14$  ng / ml im 17-OH-Progesteron-RIA. Diese Werte liegen in oder knapp unter der Sensitivitätsgrenze des jeweiligen Radioimmunoassays.

#### Die Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse der Prüfung der Reproduzierbarkeit der Steroid - RIA sind in Tab.14 zusammengefaßt.

Als Untersuchungsmaterial dient ein Plasma - " Pool " männlicher Erwachsener, dem je 1.0 ng / ml Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron zugesetzt sind. Der durch diese Maßnahme geschaffene Konzentrationsbereich des Plasma - " Pools " ist repräsentativ für den Meßbereich, den ein großer Teil der Meßwerte einnimmt . Die Werte für die Intra - Assay - und Inter - Assay - Variationskoeffizienten in den drei RIA sprechen für eine hohe Reproduzierbarkeit der radioimmunologischen Messungen .

#### Die Richtigkeit

Die Ergebnisse der zur Kontrolle der Richtigkeit der Steroid-Radioimmunoassays durchgeführten Versuche zeigen die graphischen Darstellungen in Abb. 26. Sowohl im Wiederfindungs- als auch im Parallelitätstest bestehen durchwegs gute Korrelationen zwischen den verschiedenen bekannten Ausgangs- und gemessenen Endwerten . Beim Einsatz größerer Steroidmengen ( 500 pg ) bzw. Plasmavolumina ( 1.000 ml ) ist die Reproduzierbarkeit der Richtigkeitsprüfungen etwas eingeschränkt .

#### 3.1.4. ERGEBNISSE DER ARBEITSWEISE BEI DER ENZYMATISCHEN CHOLESTERINBESTIMMUNG

Zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der enzymatischen Cholesterinbestimmungen werden Messungen zur Prüfung der Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode durchgeführt. Die Richtigkeit der Methode wird durch wiederholte Analyse der Precimat<sup>R</sup>-Standardlösung mit bekannter Konzentration an freiem Cholesterin in ver-

schiedenen Bestimmungsansätzen geprüft. Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse werden die Konzentrationen des freien und des Gesamt - Cholesterins im Plasma eines männlichen Erwachsenen sowohl einfach in verschiedenen Untersuchungsgängen als auch mehrfach im gleichen Untersuchungsgang gemessen.

In Tab.15 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefaßt .

|                               | HUMANPLASMA (männlich ) |                     |                     |                     | STANDARD                                  |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------------|
|                               | Gesamtcholesterin       |                     | Freies Cholesterin  |                     | Cholesterin-<br>Sollwert :<br>5.17 mMol/l |
| Anzahl der Analysen-<br>gänge | 1                       | 8                   | 1                   | 8                   | 13                                        |
| Anzahl der Proben             | 5                       | 13                  | 5                   | 13                  | 16                                        |
| MW<br>(mMol/l)                | 5.39                    | 5.36                | 1.81                | 1.93                | 5.30                                      |
| SD<br>(mMol/l)                | 0.12                    | 0.26                | 0.08                | 0.16                | 0.19                                      |
| VK<br>( % )                   | 2.32                    | 4.95                | 4.35                | 8.29                | 3.62                                      |
| Bereich<br>(mMol/l)           | 5.24<br>bis<br>5.59     | 4.79<br>bis<br>5.74 | 1.67<br>bis<br>1.86 | 1.56<br>bis<br>2.24 | 5.05<br>bis<br>5.78                       |

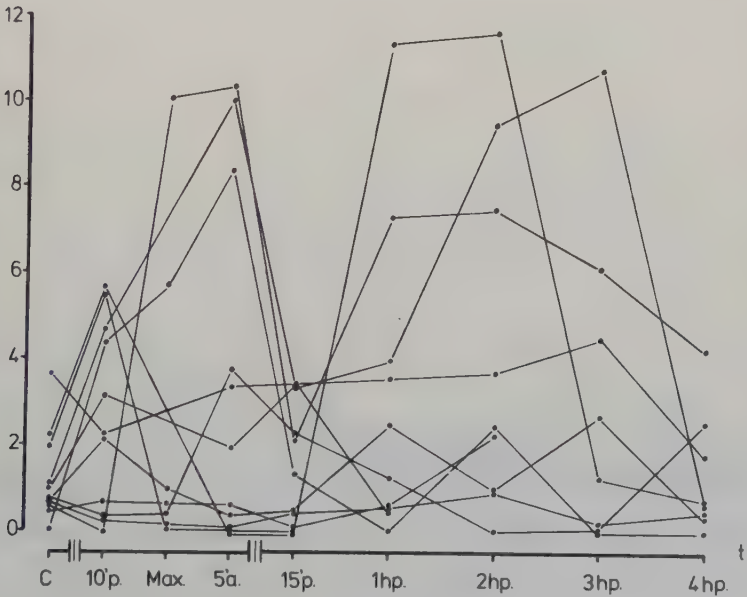
Tab. 15 : Statistische Daten zur Qualitätskontrolle der enzymatischen Cholesterinbestimmung

| Versuchs-<br>tiere der | Geschlecht<br>(m,w) | Alter<br>(Tage) | Gewicht<br>(Gramm) | Oligämie-<br>(Minuten) | Überlebenszeit<br>(Minuten) |
|------------------------|---------------------|-----------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| Kontroll-<br>gruppe    |                     |                 |                    |                        |                             |
| 26.03.73               | w                   | 23              | 1320               | 64                     | 64                          |
| 14.05.73               | m                   | 20              | 1670               | 43                     | 432                         |
| 15.05.73               | w                   | 21              | 1720               | 139                    | 176                         |
| 18.05.73               | m                   | 17              | 1627               | 112                    | 512                         |
| 28.05.73               | m                   | 27              | 2100               | 47                     | 296                         |
| 03.07.73               | m                   | 13              | 1090               | 338                    | 975                         |
| 05.07.73               | m                   | 15              | 1360               | 128                    | 32                          |
| 06.07.73               | w                   | 16              | 1190               | 207                    | 582                         |
| 24.07.73               | w                   | 16              | 886                | 315                    | 1159                        |
| 01.08.73               | w                   | 24              | 1100               | 69                     | 1099                        |
| 07.08.73               | w                   | 23              | 980                | 221                    | 276                         |
| Therapie-<br>gruppe 1  |                     |                 |                    |                        |                             |
| 18.07.72               | w                   | 15              | 1096               | 80                     | 300                         |
| 21.07.72               | m                   | 19              | 908                | 93                     | 310                         |
| 24.08.72 I             | m                   | 24              | 1125               | 51                     | 2880 U                      |
| 24.08.72 II            | w                   | 24              | 1110               | 52                     | 125                         |
| 25.08.72               | m                   | 25              | 1110               | 41                     | 242                         |
| 23.11.72               | m                   | 17              | 1045               | 63                     | 271                         |
| 05.12.72               | m                   | 24              | 2220               | 355                    | 223                         |
| 16.05.73               | w                   | 22              | 1540               | 78                     | 2880 U                      |
| Therapie-<br>gruppe 2  |                     |                 |                    |                        |                             |
| 20.07.72               | w                   | 18              | 926                | 70                     | 443                         |
| 01.12.72               | m                   | 25              | 1430               | 92                     | 1340                        |
| 06.12.72               | m                   | 25              | 2280               | 215                    | 2880 U                      |
| 07.12.72               | m                   | 26              | 2560               | 257                    | 2181                        |
| 09.01.73               | w                   | 22              | 1726               | 60                     | 360                         |
| 10.01.73               | w                   | 23              | 1825               | 85                     | 2880 U                      |
| 28.03.73               | w                   | 25              | 1202               | 43                     | 343                         |
| 22.05.73               | w                   | 21              | 1590               | 181                    | 2880 U                      |
| 04.07.73               | m                   | 14              | 1095               | 286                    | 1837                        |
| 09.07.73               | m                   | 19              | 1325               | 282                    | 2880 U                      |

Tab.16 : Individual - ( Geschlecht, Alter, Gewicht ) und schockexperimentelle ( Oligämiezeit, Überlebenszeit ) Daten der Versuchstiere der Kontrollgruppe und der Therapiegruppen 1 und 2 . U = Überlebt

| Versuchs-<br>tier vom: | Ktr. | 10'n | Max.  | 5'v   | 15'n | 1h n  | 2h n  | 3h n  | 4h n  |
|------------------------|------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| 26.03.73               | 0.98 | 3.15 |       | 1.89  | 3.41 | 0.41  |       |       |       |
| 14.05.73               | 3.63 | 2.26 |       | 3.34  | 3.41 | 3.53  | 3.68  | 4.49  | 1.75  |
| 15.05.73               | 0.41 | 0.68 | 0.63  | 0.58  | 0.08 | 0.57  | 2.23  |       |       |
| 18.05.73               | 0.62 | 0.24 | 0.19  | 0.10  | 0.43 | 0.54  | 0.90  | 0.23  | 0.38  |
| 28.05.73               | 1.08 | 4.69 |       | 10.00 | 3.34 | 3.96  | 9.49  | 10.75 | 0.60  |
| 03.07.73               | 0.74 | 0.35 | 0.38  | 3.75  | 2.28 | 1.23  | 0.00  | 0.05  | 2.51  |
| 05.07.73               | 1.92 | 5.46 | 0.00  | 0.00  | 0.00 |       |       |       |       |
| 06.07.73               | 0.00 | 4.35 | 5.71  | 8.40  | 1.30 | 0.00  | 2.41  | 0.00  | 0.00  |
| 24.07.73               | 0.57 | 0.00 | 10.07 | 10.35 | 2.10 | 7.32  | 7.50  | 6.13  | 4.24  |
| 01.08.73               | 2.21 | 5.64 |       | 0.00  | 0.00 | 1.35  | 1.60  | 1.25  | 0.70  |
| 07.08.73               | 0.66 | 2.13 | 0.99  | 0.32  | 0.48 | 2.45  | 0.95  | 2.69  | 0.31  |
| MW                     | 1.16 | 2.63 | 2.57  | 3.52  | 1.53 | 2.14  | 3.20  | 3.20  | 1.31  |
| SD                     | 1.04 | 2.16 | 3.86  | 4.13  | 1.43 | 2.27  | 3.22  | 3.79  | 1.45  |
| VK(%)                  | 89.1 | 81.9 | 150.4 | 117.3 | 93.3 | 106.1 | 100.8 | 118.3 | 110.4 |

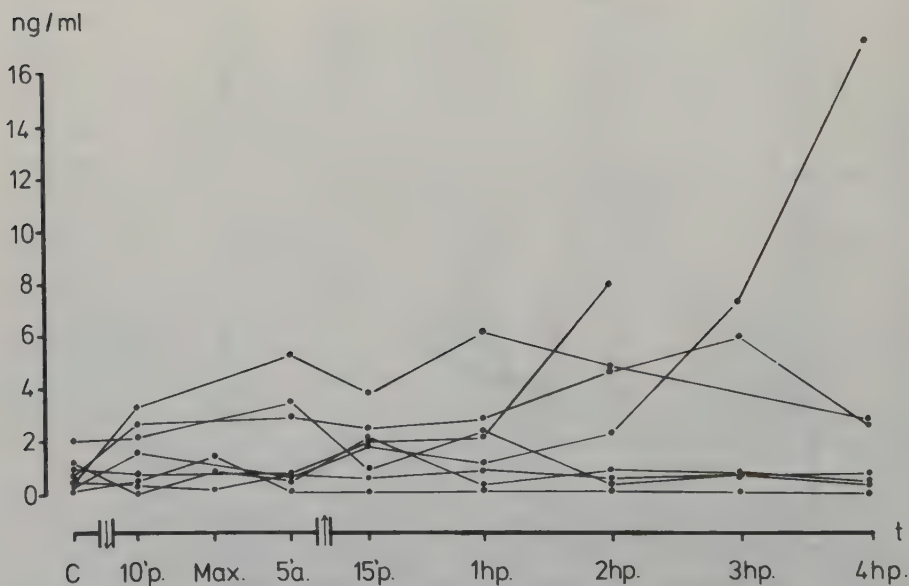
ng/ml



Tab.17 Plasmakonzentrationen von Progesteron ( ng/ml )

Abb.27 bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe ( NaCl )

| Versuchstier vom: | Ktr. | 10'n | Max. | 5'v   | 15'n | 1h n  | 2h n  | 3h n  | 4h n  |
|-------------------|------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| 18.07.72          | 0.53 | 0.34 | 0.13 | 0.71  | 0.56 | 0.82  | 0.50  | 0.59  | 0.72  |
| 21.07.72          | 0.26 | 1.62 |      | 0.53  | 1.83 | 1.06  | 2.24  | 7.29  | 17.24 |
| 24.08.72          | 0.69 | 2.67 |      | 2.90  | 2.42 | 2.74  | 4.61  | 5.97  | 2.57  |
| I                 |      |      |      |       |      |       |       |       |       |
| 24.08.72          | 1.00 | 0.72 |      | 0.71  | 1.98 | 2.04  | 7.92  |       |       |
| II                |      |      |      |       |      |       |       |       |       |
| 25.08.72          | 0.63 | 3.31 |      | 5.29  | 3.83 | 6.08  | 4.57  |       | 2.75  |
| 23.11.72          | 1.14 | 0.00 | 0.80 | 0.52  | 2.02 | 0.29  | 0.85  | 0.69  | 0.41  |
| 05.12.72          | 0.21 | 0.48 | 1.45 | 0.00  | 0.00 | 0.06  | 0.00  | 0.00  | 0.00  |
| 16.05.73          | 2.05 | 2.13 |      | 3.49  | 0.92 | 2.23  | 0.24  | 0.53  | 0.37  |
| MW                | 0.83 | 1.41 | 0.79 | 1.77  | 1.70 | 1.92  | 2.62  | 2.51  | 4.01  |
| SD                | 0.60 | 1.21 | 0.66 | 1.89  | 1.20 | 1.93  | 2.83  | 3.23  | 6.57  |
| VK(%)             | 72.6 | 85.8 | 83.2 | 107.1 | 70.7 | 100.9 | 108.3 | 128.4 | 163.8 |

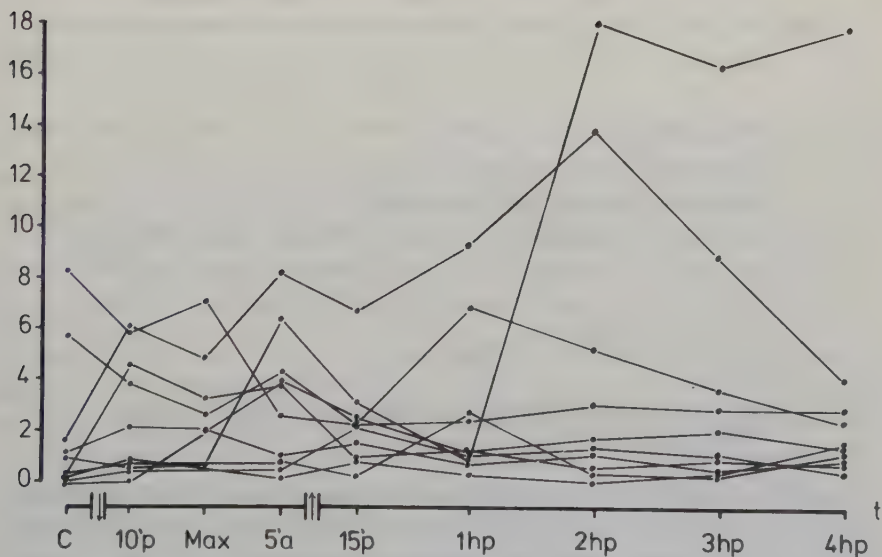


Tab.18 Plasmakonzentrationen von Progesteron ( ng/ml )

Abb.28 bei den Versuchstieren der Therapie gruppe 1

| Versuchstier vom: | Ktr.  | 10'n | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n  | 2h n  | 3h n  | 4h n  |
|-------------------|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 20.07.72          | 0.00  | 0.43 |      | 0.47 | 2.17 | 1.08  | 1.40  | 1.10  | 0.44  |
| 01.12.72          | 0.90  | 0.47 | 0.63 | 6.44 | 3.11 | 0.99  | 18.14 | 16.37 | 17.94 |
| 06.12.72          | 1.13  | 2.14 | 2.03 | 1.01 | 1.55 | 0.75  | 1.09  | 0.54  | 1.96  |
| 07.12.72          | 0.18  | 4.56 | 3.27 | 2.87 | 0.93 | 1.28  | 0.60  | 0.92  | 0.78  |
| 09.01.73          | 0.12  | 0.81 |      | 0.18 | 0.85 | 0.34  | 0.01  | 0.38  | 1.59  |
| 10.01.73          | 0.00  | 0.00 |      | 3.94 | 2.53 | 1.03  | 1.76  | 2.04  | 1.43  |
| 28.03.73          | 0.22  | 0.71 |      | 0.82 | 0.22 | 2.72  | 0.30  | 0.31  | 1.18  |
| 22.05.73          | 5.73  | 3.86 | 2.66 | 4.30 | 2.29 | 6.88  | 5.27  | 3.57  | 2.39  |
| 04.07.73          | 8.29  | 5.81 | 7.02 | 2.52 | 2.23 | 2.45  | 3.07  | 2.94  | 2.92  |
| 09.07.73          | 1.66  | 6.01 | 4.86 | 8.23 | 6.77 | 9.25  | 13.97 | 8.95  | 4.08  |
| MW                | 1.82  | 2.48 | 3.41 | 3.02 | 2.27 | 2.68  | 4.56  | 3.71  | 3.48  |
| SD                | 2.85  | 2.36 | 2.25 | 2.67 | 1.81 | 2.98  | 6.33  | 5.15  | 5.19  |
| VK(%)             | 156.5 | 95.2 | 66.0 | 88.6 | 80.0 | 111.5 | 138.7 | 138.7 | 149.3 |

ng/ml



Tab.19 Plasmakonzentrationen von Progesteron ( ng/ml )

Abb.29 bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2

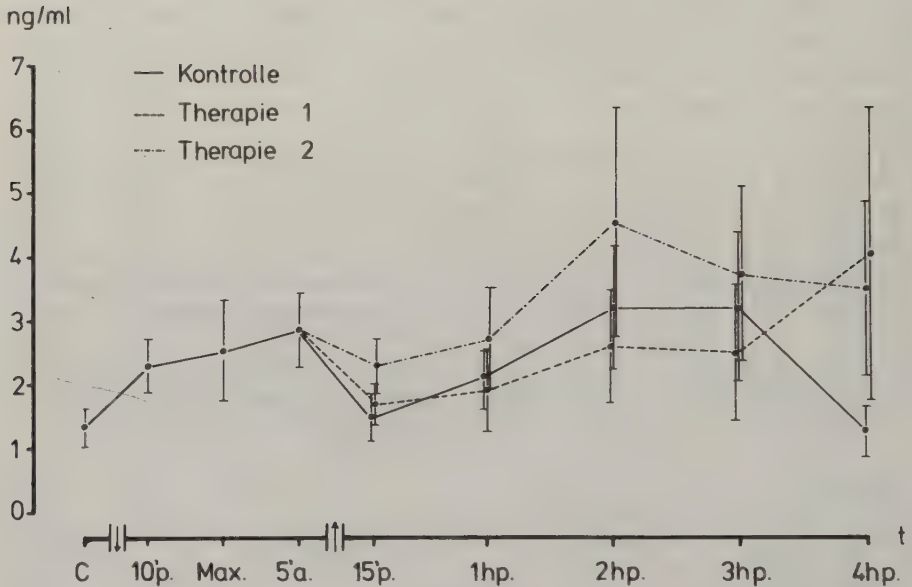


Abb. 30 : Progesteron ( ng/ml ; MW  $\pm$  SEM ) bei Hundwelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock

Kontrolle: Keine Hormontherapie

Therapie 1 : 1 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion

Therapie 2 : 2 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion

Die Pfeile kennzeichnen Anfang und Ende der oligämischen Schockphase .

### 3.2. ERGEBNISSE DER MESSUNGEN AM UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Die mittlere Dauer der hypovolämischen Phase des hämorrhagischen Schocks beträgt bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe  $153 \pm 104$  ( SD ) min, bei denen der Therapiegruppe 1  $101 \pm 103$  ( SD ) min und bei denen der Therapiegruppe 2  $147 \pm 98$  ( SD ) min . Zwischen diesen Mittelwerten besteht kein statistisch signifikan-

ter Unterschied. Aus diesem Grund wird bei den vor Reinfusion bzw. Therapieeinleitung + Reinfusion gemessenen Werten zwischen den drei Gruppen kein Unterschied in den graphischen Darstellungen gemacht. Überdies unterscheiden sich die drei Versuchsgruppen weder nach dem Alter ( Kontrollgruppe:  $19.5 \pm 5.4$ , Therapiegruppe 1:  $21.2 \pm 3.7$ , Therapiegruppe 2:  $21.8 \pm 3.6$  Tage ) noch nach dem Gewicht ( Kontrollgruppe:  $1367 \pm 372$ , Therapiegruppe 1:  $1281 \pm 434$ , Therapiegruppe 2:  $1557 \pm 508$  Gramm ) der Tiere signifikant. Schließlich scheidet auch ein Einfluß der circadianen Rhythmizität der NNR-Hormonsekretion ( sofern er bei den jungen Tieren überhaupt schon besteht oder voll ausgeprägt ist ) als Ursache für unterschiedliches Schockverhalten der Versuchstiere aus, da 27 der 29 Welpen zu einem Zeitpunkt zwischen 9 h und ca. 13.30 h entblutet worden sind. Die zwei Tiere ( vom 18.07.72 und 24.08.72 II ), bei denen der Schock erst gegen Abend eingeleitet worden ist, zeigen weder in den Ausgangs- noch in den Schockwerten deutlich andere Reaktionen als die übrigen ( Tab.16 ).

### 3.2.1. ERGEBNISSE DER NNR-HORMONBESTIMMUNGEN

#### 3.2.1.1. Meßergebnisse: Progesteron

( Tab.17, 18, 19 ; Abb.27, 28, 29, 30 )

Die mittlere Progesteron-Konzentration im peripheren Plasma der Hundewelpen vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks beträgt  $1.30 \pm 0.34$  ( SEM ) ng/ml . Einheitliche Beziehungen der Einzelwerte zum Geschlecht der Versuchstiere sind nicht feststellbar .

In der oligämischen Schockphase zeigt das Plasma-Progesteron einen biphasischen Anstieg: Nach einem relativ steilen Anstieg während der Entblutung, der sich nach zehn Minuten in einer Plasmakonzentration von 2.24 ng/ml manifestiert, erhöht sich der Spiegel bis zum Maximum der Blutabgabe und in der zweiten Hälfte der Oligämiezeit nur mehr wenig ( Abb.30 ). Am Ende der hypovolämischen Schockphase ist die mittlere Plasma-Progesteron-Konzentration mehr als doppelt so hoch wie zur Kontrollzeit. Ein Zusammenhang zwischen den 5 min vor Beginn der Reinfusion ermittelten Einzelwerten und den individuellen Oligämie- bzw. Überlebenszeiten ist nicht nachzuweisen.

15 min nach Ende der Reinfusion liegt das Plasma-Progesteron in allen Gruppen z.T. erheblich niedriger als vor der Rückblutung. Dieser Konzentrationsabfall ist auf die Verdünnung des zirkulierenden Blutvolumens durch das relativ progesteronarme extrakorporale Blutvolumen bei der Reinfusion zurückzuführen. In der normovolämischen Schockphase zeigen die Progesteron-Mittelwertskurven der drei Gruppen einen weitgehend parallelen Verlauf mit einem recht deutlichen Peak 2 h nach Ende der Reinfusion. Ein auffälliger Unterschied im Verhalten des Progesterons in der Schock-Nachphase innerhalb der Kontrollgruppe zwischen den drei Tieren, die vor Ende des Versuchs sterben, und den übrigen, die länger als vier Stunden überleben, ist nicht erkennbar. Allerdings findet sich zwischen den jeweils letzten Progesteron-Meßwerten und den Überlebenszeiten der Einzeltiere in dieser Gruppe ein angedeuteter Zusammenhang ( $r = 0.5684$ ,  $p < 0.10$ ). In den beiden Therapiegruppen fehlt diese Beziehung.

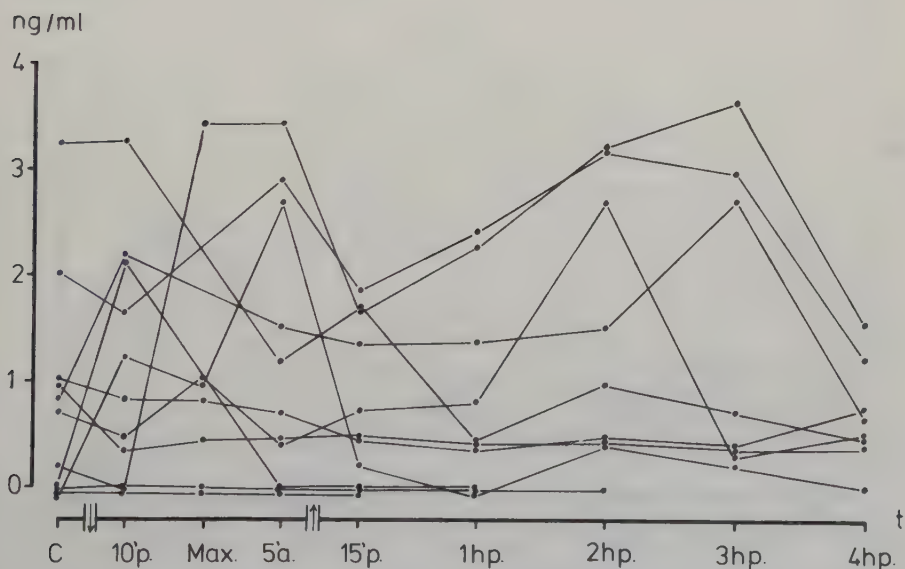
### 3.2.1.2. Meßergebnisse: DOC

( Tab. 20, 21, 22 ; Abb.31, 32, 33, 34 )

Die mittlere DOC-Konzentration im peripheren Plasma der Hundewelpen vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks beträgt  $1.39 \pm 0.36$  ( SEM ) ng/ml. Beziehungen zwischen den Einzelwerten und dem Alter, dem Gewicht oder dem Geschlecht der Tiere lassen sich nicht herstellen.

Ähnlich wie Progesteron zeigt DOC zwischen den Meßwerten zur Kontrollzeit und 10 min nach Entblutung einen relativ steilen Anstieg der Plasmakonzentration, der im weiteren Verlauf der oligämischen Schockphase dann allerdings erheblich flacher verläuft ( Abb.34 ). Während ein Zusammenhang zwischen der Plasma-DOC-Konzentration 5 min vor Rückblutung und der Oligämiedauer fehlt, ist die Beziehung der zu diesem Zeitpunkt ermittelten DOC-Meßwerte zur Überlebenszeit der Tiere statistisch signifikant ( $p < 0.05$ ). Diese Korrelation kommt zusätzlich darin zum Ausdruck, daß 5 min vor Reinfusion der DOC-Mittelwert bei den Tieren der Therapie -

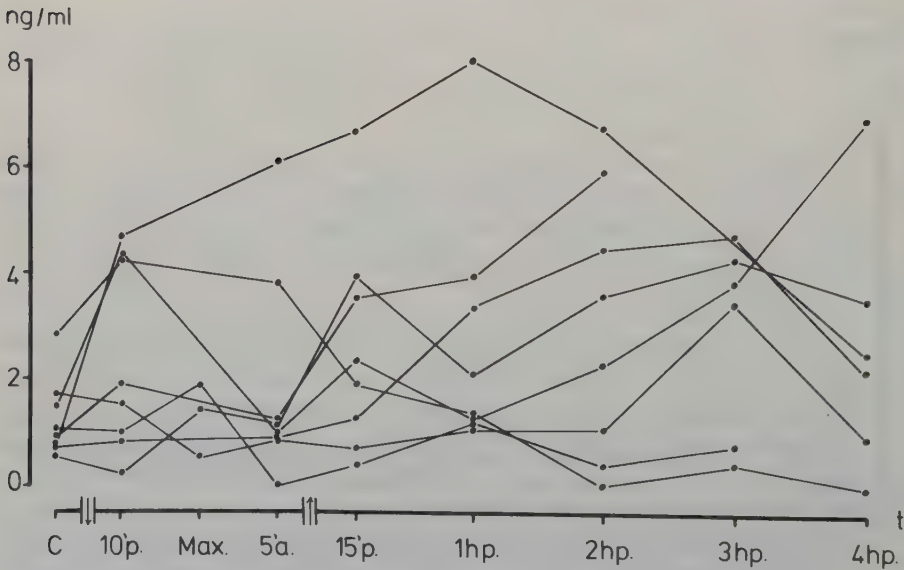
| Versuchstier vom: | Ktr.  | 10'n | Max.  | 5'v   | 15'n | 1h n  | 2h n | 3h n  | 4h n |
|-------------------|-------|------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 26.03.73          | 0.00  | 2.11 |       | 0.00  | 0.00 | 0.00  |      |       |      |
| 14.05.73          | 2.01  | 1.64 |       | 2.90  | 1.87 | 2.43  | 3.19 | 2.97  | 1.22 |
| 15.05.73          | 0.00  | 0.00 | 0.00  | 0.00  | 0.00 | 0.00  | 0.00 |       |      |
| 18.05.73          | 1.02  | 0.83 | 0.81  | 0.67  | 0.45 | 0.34  | 0.49 | 0.38  | 0.75 |
| 28.05.73          | 0.83  | 2.17 |       | 1.52  | 1.34 | 1.37  | 1.51 | 2.71  | 0.65 |
| 03.07.73          | 0.76  | 0.45 | 1.02  | 0.40  | 0.66 | 0.69  | 2.69 | 0.31  | 0.52 |
| 05.07.73          | 0.00  | 0.00 | 0.00  | 0.00  | 0.00 |       |      |       |      |
| 06.07.73          | 0.00  | 1.23 | 0.96  | 2.70  | 0.18 | 0.00  | 0.42 | 0.17  | 0.00 |
| 24.07.73          | 0.17  | 0.00 | 3.43  | 3.40  | 1.65 | 2.25  | 3.19 | 3.65  | 1.55 |
| 01.08.73          | 3.24  | 3.27 |       | 1.19  | 1.79 | 0.20  | 0.99 | 0.72  | 0.45 |
| 07.08.73          | 0.93  | 0.35 | 0.44  | 0.45  | 0.45 | 0.39  | 0.37 | 0.35  | 0.39 |
| MW                | 0.81  | 1.10 | 0.95  | 1.20  | 0.76 | 0.77  | 1.43 | 1.41  | 0.69 |
| SD                | 1.02  | 1.09 | 1.17  | 1.26  | 0.75 | 0.93  | 1.28 | 1.44  | 0.49 |
| VK(%)             | 125.4 | 99.5 | 123.2 | 104.8 | 98.9 | 120.9 | 89.5 | 102.4 | 70.8 |



Tab. 20 Plasmakonzentrationen von D O C ( ng/ml )

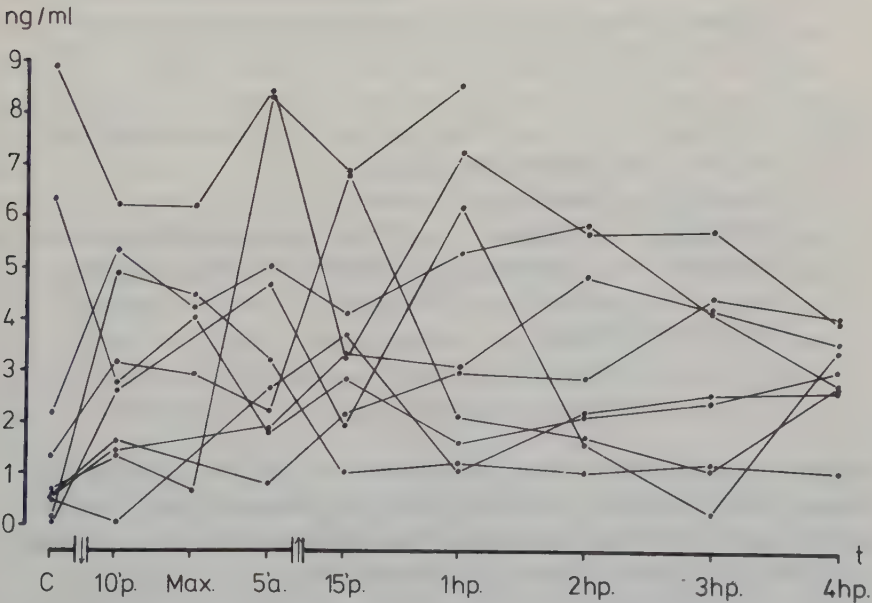
Abb. 31 bei den Versuchstieren der K o n t r o l l gruppe (NaCl)

| Versuchs-<br>tier vom: | Ktr. | 10'n | Max. | 5'v   | 15'n | 1h n | 2h n | 3h n | 4h n |
|------------------------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|
| 18.07.72               | 1.70 | 1.52 | 0.46 | 0.84  | 0.72 | 1.08 | 1.10 | 3.49 | 0.91 |
| 21.07.72               | 1.49 | 4.32 |      | 0.97  | 2.34 | 1.30 | 2.27 | 3.84 | 6.99 |
| 24.08.72<br>I          | 0.73 | 0.82 |      | 0.88  | 1.27 | 3.42 | 4.42 | 4.75 | 2.19 |
| 24.08.72<br>II         | 0.90 | 1.90 |      | 1.24  | 3.54 | 3.94 | 5.92 |      |      |
| 25.08.72               | 0.76 | 4.65 |      | 6.13  | 6.68 | 8.03 | 6.75 |      | 2.54 |
| 23.11.72               | 0.51 | 0.19 | 1.40 | 1.18  | 3.97 | 2.08 | 3.61 | 4.27 | 3.54 |
| 05.12.72               | 1.01 | 0.95 | 1.86 | 0.00  | 0.40 | 1.23 | 0.40 | 0.78 |      |
| 16.05.73               | 2.80 | 4.26 |      | 3.82  | 1.91 | 1.32 | 0.03 | 0.45 | 0.01 |
| MW                     | 1.24 | 2.33 | 1.24 | 1.88  | 2.60 | 2.80 | 3.06 | 2.93 | 2.70 |
| SD                     | 0.75 | 1.80 | 0.71 | 2.04  | 2.07 | 2.37 | 2.53 | 1.85 | 2.44 |
| VK(%)                  | 60.3 | 77.4 | 57.5 | 108.4 | 79.6 | 84.8 | 82.5 | 63.0 | 90.6 |



Tab.21 Plasmakonzentrationen von D O C ( ng/ml )  
Abb.32 bei den Versuchstieren der T h e r a p i e g r u p p e 1

| Versuchs-<br>tier vom: | Ktr.  | 10'n | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n | 2h n  | 3h n  | 4h n  |
|------------------------|-------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| 20.07.72               | 0.63  | 1.46 |      | 1.85 | 3.34 | 3.13 | 4.77  | 4.23  | 3.55  |
| 01.12.72               | 0.65  | 1.35 | 0.68 | 8.36 | 6.86 | 8.54 | 31.90 | 22.85 | 20.14 |
| 06.12.72               | 1.33  | 3.19 | 2.97 | 2.22 | 6.78 | 2.12 | 1.71  | 1.11  | 2.65  |
| 07.12.72               | 0.15  | 4.93 | 4.48 | 3.22 | 1.06 | 1.22 | 1.03  | 1.18  | 1.03  |
| 09.01.73               | 0.56  | 1.64 |      | 0.83 | 2.16 | 3.00 | 2.88  | 4.42  | 4.07  |
| 10.01.73               | 0.53  | 0.01 |      | 2.69 | 3.71 | 1.04 | 2.20  | 2.54  | 2.59  |
| 28.03.73               | 0.09  | 2.57 |      | 4.68 | 1.93 | 6.18 | 1.59  | 0.24  | 3.40  |
| 22.05.73               | 8.87  | 6.25 | 6.22 | 8.44 | 3.37 | 7.27 | 5.69  | 5.73  | 3.97  |
| 04.07.73               | 6.33  | 2.74 | 4.03 | 1.81 | 2.85 | 1.62 | 2.22  | 2.42  | 3.00  |
| 09.07.73               | 2.21  | 5.34 | 4.26 | 5.07 | 4.18 | 5.33 | 5.70  | 4.20  | 2.69  |
| MW                     | 2.14  | 2.95 | 3.77 | 3.92 | 3.62 | 3.95 | 5.97  | 4.89  | 4.71  |
| SD                     | 3.00  | 1.99 | 1.84 | 2.69 | 1.92 | 2.69 | 9.27  | 6.55  | 5.49  |
| VK(%)                  | 140.7 | 67.8 | 48.9 | 68.7 | 52.9 | 68.2 | 155.3 | 133.8 | 116.6 |



Tab.22 Plasmakonzentrationen von D O C ( ng/ml )

Abb.33 bei den Versuchstieren der T h e r a p i e g r u p p e 2

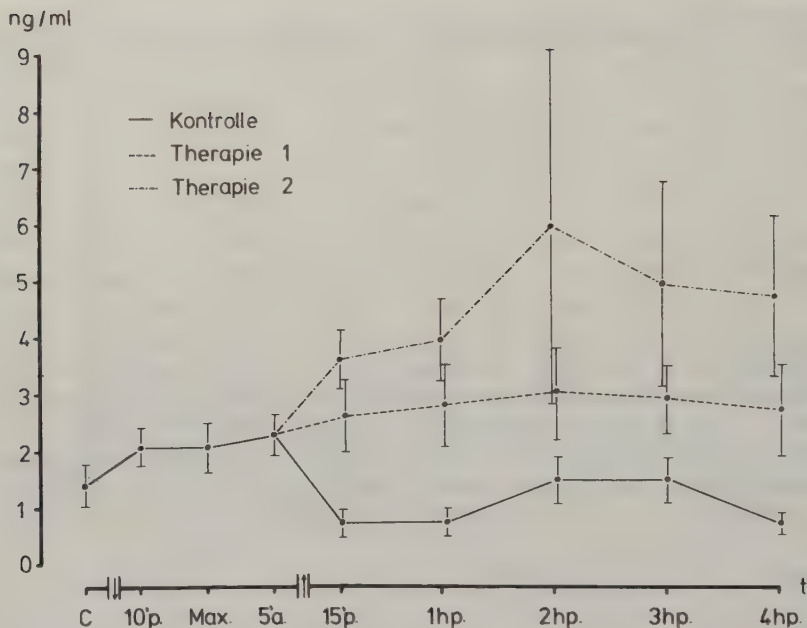


Abb.34 DOC ( ng/ml ; MW  $\pm$  SEM ) bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock  
 Kontrolle: Keine Hormontherapie  
 Therapie 1 : 1 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion  
 Therapie 2 : 2 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion  
 Die Pfeile kennzeichnen Anfang und Ende der oligämischen Schockphase

gruppe 2 signifikant (  $p < 0.01$  ) höher ist als in der Kontrollgruppe. Beim Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe 1 ist ein Unterschied der DOC-Mittelwerte zu diesem Zeitpunkt statistisch nicht zu verifizieren.

In der normovolämischen Schockphase sind zwischen den Gruppen deutliche Unterschiede im Verhalten des Plasma-DOC festzustellen: In der Kontrollgruppe erhöht sich der nach der Reinfusion zu-

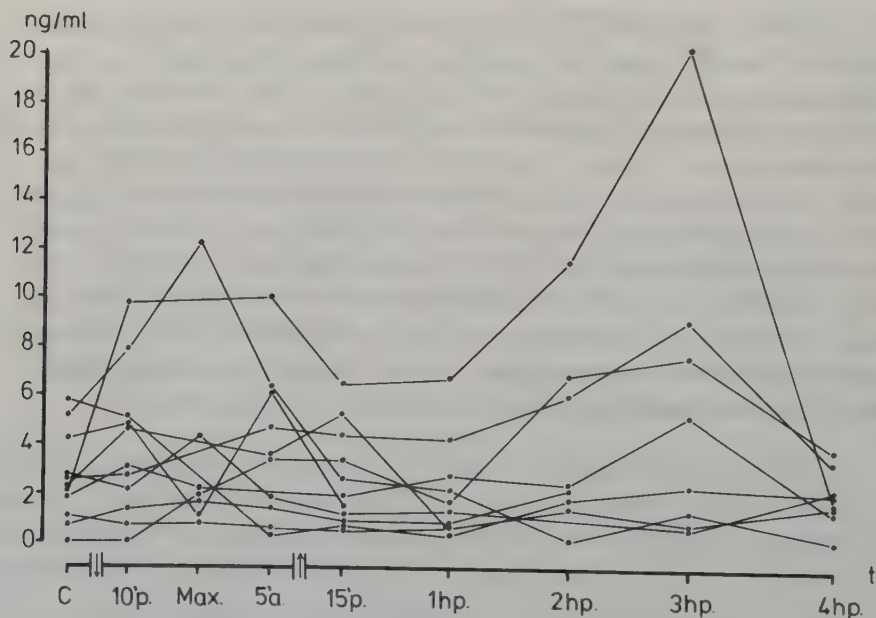
nächst auf das Ausgangsniveau zurückgekehrte DOC-Spiegel in der Mitte der normovolämischen Schockphase nur mäßig ( Peak: 1.43 ng/ml 2 h nach Reinfusion ), um gegen Versuchsende erneut abzusinken. Ein Zusammenhang zwischen dem jeweils letzten Meßwert und der Überlebenszeit der Welpen ist lediglich angedeutet (  $r = 0.5652$ ,  $p < 0.10$  ). Sämtliche Tiere dieser Gruppe, die vor Versuchsende sterben, besitzen nach Beendigung der Reinfusion keinen meßbaren Plasma-DOC-Spiegel mehr.

In der Therapiegruppe 1 besteht zwischen den jeweils letzten DOC-Meßwerten der Tiere, die noch während des Versuchs sterben, und der Tiere, die länger als 4 h überleben, kein Unterschied. 3 h nach Reinfusion ist der DOC-Plasmaspiegel in dieser Gruppe gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht (  $p < 0.05$  ).

Der mittlere DOC-Spiegel der Versuchstiere in der Therapiegruppe 2 erhöht sich in der Schock-Nachphase beträchtlich und erreicht 2 h nach Reinfusion einen deutlichen Peak ( 5.97 ng/ml ), um anschließend wieder abzusinken.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Schock-Nachphase bestehen bei den DOC-Mittelwerten zwischen der Kontrollgruppe und den Therapiegruppen erhebliche Unterschiede: In der Therapiegruppe 1 ist der DOC-Spiegel gegenüber dem der Kontrollgruppe 15 min nach Reinfusion und 3 h nach Reinfusion signifikant (  $p < 0.05$  ) erhöht. Zu den übrigen Zeiten sind die Unterschiede nicht signifikant. In der Therapiegruppe 2 ist die mittlere Plasma-DOC-Konzentration gegenüber der in der Kontrollgruppe 15 min (  $p < 0.01$  ), 1 h (  $p < 0.01$  ), 2 h (  $p < 0.05$  ) und 4 h (  $p < 0.01$  ) jeweils nach Reinfusion, signifikant erhöht. Zwischen den DOC-Mittelwerten der beiden Therapiegruppen fehlen während der normovolämischen Schockphase statistisch nachweisbare Unterschiede.

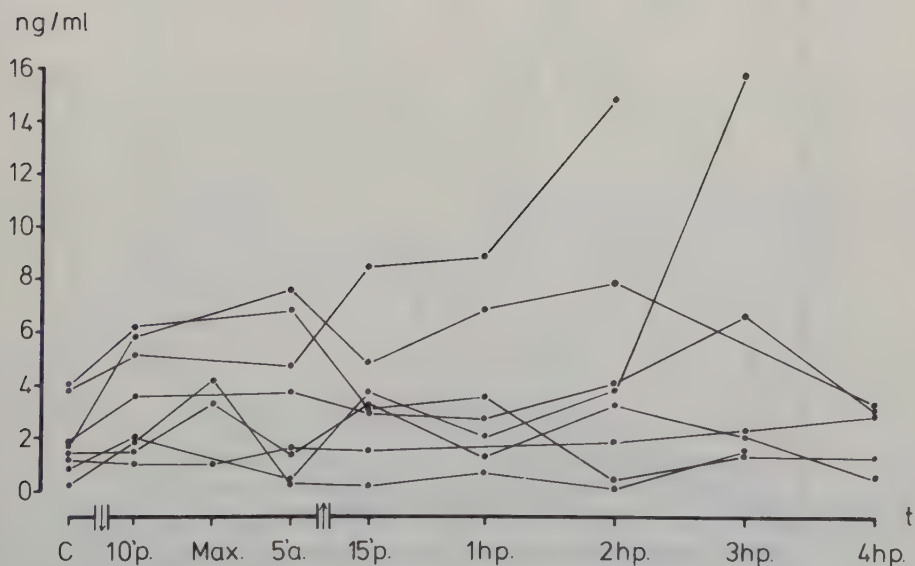
| Versuchs-<br>tier vom: | Ktr. | 10'n | Max.  | 5'v   | 15'n | 1h n | 2h n  | 3h n  | 4h n |
|------------------------|------|------|-------|-------|------|------|-------|-------|------|
| 26.03.73               | 2.25 | 4.60 |       | 3.54  | 5.30 | 0.70 |       |       |      |
| 14.05.73               | 2.60 | 2.64 |       | 4.70  | 4.46 | 4.25 | 6.04  | 9.15  | 3.43 |
| 15.05.73               | 0.69 | 1.35 | 1.56  | 1.36  | 0.84 | 0.83 | 2.18  |       |      |
| 18.05.73               | 1.00 | 0.70 | 0.75  | 0.57  | 0.58 | 0.73 | 1.38  | 0.75  | 1.58 |
| 28.05.73               | 2.05 | 9.79 |       | 10.50 | 6.51 | 6.80 | 11.55 | 20.17 | 1.58 |
| 03.07.73               | 2.77 | 2.13 | 4.33  | 1.86  | 1.19 | 1.29 |       | 0.65  | 2.21 |
| 05.07.73               | 4.23 | 4.81 | 1.02  | 6.04  | 1.50 |      |       |       |      |
| 06.07.73               | 5.14 | 7.98 | 12.26 | 6.32  | 2.61 | 2.16 | 0.02  | 1.34  | 0.05 |
| 24.07.73               | 0.00 | 0.00 | 1.96  | 3.45  | 3.40 | 1.65 | 6.92  | 7.77  | 3.93 |
| 01.08.73               | 5.82 | 5.14 |       | 0.28  | 0.67 | 0.34 | 1.83  | 2.24  | 2.14 |
| 07.08.73               | 1.84 | 3.05 | 2.18  |       | 1.92 | 2.76 | 2.48  | 5.29  | 1.47 |
| MW                     | 2.58 | 3.83 | 3.44  | 3.86  | 2.63 | 2.15 | 4.05  | 5.92  | 2.05 |
| SD                     | 1.83 | 3.03 | 4.06  | 3.16  | 2.03 | 2.01 | 3.83  | 6.62  | 1.21 |
| VK(%)                  | 70.9 | 78.9 | 118.2 | 81.8  | 77.1 | 93.7 | 94.6  | 111.8 | 59.1 |



Tab.23 Plasmakonzentrationen von 17-OH-Progesteron (ng/ml)

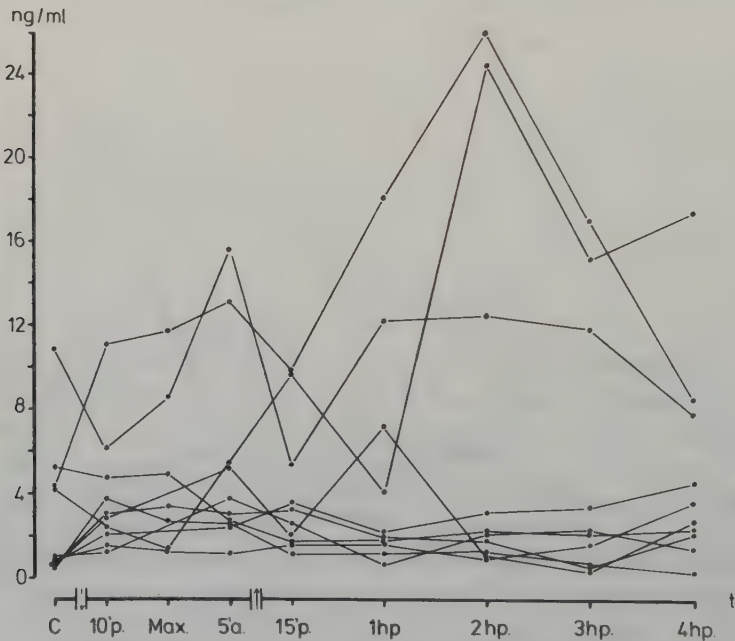
Abb.35 bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe (NaCl)

| Versuchs-<br>tier vom: | Ktr. | 10'n | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n | 2h n  | 3h n  | 4h n  |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| 18.07.72               | 1.26 | 1.05 | 1.02 | 1.60 | 1.57 |      | 1.84  | 2.24  | 2.87  |
| 21.07.72               | 0.87 | 2.04 |      | 0.43 | 3.78 | 2.04 | 3.84  | 15.87 | 32.79 |
| 24.08.72<br>I          | 1.97 | 3.61 |      | 3.82 | 3.07 | 2.71 | 4.01  | 6.65  | 3.15  |
| 24.08.72<br>II         | 3.87 | 5.22 |      | 4.79 | 8.55 | 8.98 | 14.94 |       |       |
| 25.08.72               | 1.76 | 5.95 |      | 7.68 | 4.94 | 6.90 | 7.97  |       | 3.25  |
| 23.11.72               | 1.47 | 1.50 | 3.31 | 1.41 | 3.24 | 1.30 | 3.27  | 2.07  | 0.52  |
| 05.12.72               | 0.24 | 1.99 | 4.22 | 0.35 | 0.18 | 0.74 | 0.02  | 1.56  |       |
| 16.05.73               | 4.05 | 6.24 |      | 6.84 | 3.10 | 3.54 | 0.44  | 1.41  | 1.33  |
| MW                     | 1.94 | 3.45 | 2.85 | 3.37 | 3.55 | 3.74 | 4.54  | 4.97  | 7.32  |
| SD                     | 1.36 | 2.10 | 1.65 | 2.87 | 2.47 | 3.07 | 4.88  | 5.69  | 12.50 |
| VK(%)                  | 70.2 | 60.9 | 57.8 | 85.2 | 69.6 | 81.9 | 107.5 | 114.5 | 171.2 |



Tab.24 Plasmakonzentrationen von 17 - OH - Progesteron (ng/ml)  
Abb.36 bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1

| Versuchstier vom: | Ktr.  | 10'n  | Max.  | 5'v   | 15'n | 1h n  | 2h n  | 3h n  | 4h n  |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| 20.07.72          | 0.69  | 2.05  |       | 2.53  | 3.64 | 2.21  | 3.17  | 3.44  | 4.51  |
| 01.12.72          | 4.35  | 2.38  | 1.34  | 5.50  | 9.71 | 4.14  | 24.37 | 15.21 | 17.46 |
| 06.12.72          | 0.68  | 3.04  | 3.38  | 3.06  | 3.26 | 2.00  | 1.81  | 0.65  | 2.18  |
| 07.12.72          | 0.64  | 3.79  | 2.72  | 2.56  | 1.12 | 1.13  | 1.32  | 0.71  | 0.40  |
| 09.01.73          | 0.84  | 1.50  |       | 1.17  | 1.59 | 1.71  | 1.00  | 1.72  | 3.70  |
| 10.01.73          | 0.91  | 1.29  |       | 3.80  | 2.61 | 0.64  | 2.12  | 2.31  | 1.50  |
| 28.03.73          | 0.48  | 2.91  |       | 5.26  | 2.06 | 7.16  | 1.25  | 0.44  | 2.75  |
| 22.05.73          | 10.94 | 6.14  | 8.60  | 15.65 | 5.44 | 12.25 | 12.45 | 11.93 | 7.90  |
| 04.07.73          | 5.24  | 4.75  | 4.93  | 2.70  | 1.59 | 1.92  | 2.22  | 2.22  | 2.44  |
| 09.07.73          | 4.31  | 11.03 | 11.76 | 13.10 | 9.92 | 18.05 | 26.14 | 17.02 | 8.56  |
| MW                | 2.91  | 3.89  | 5.46  | 5.53  | 4.09 | 5.12  | 7.59  | 5.57  | 5.14  |
| SD                | 3.39  | 2.92  | 3.97  | 4.87  | 3.26 | 5.77  | 9.91  | 6.50  | 5.07  |
| VK(%)             | 116.4 | 75.0  | 72.7  | 88.1  | 79.7 | 112.6 | 130.7 | 116.7 | 98.6  |



Tab.25 Plasmakonzentrationen von 17 - OH - Progesteron (ng/ml)

Abb.37 bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2

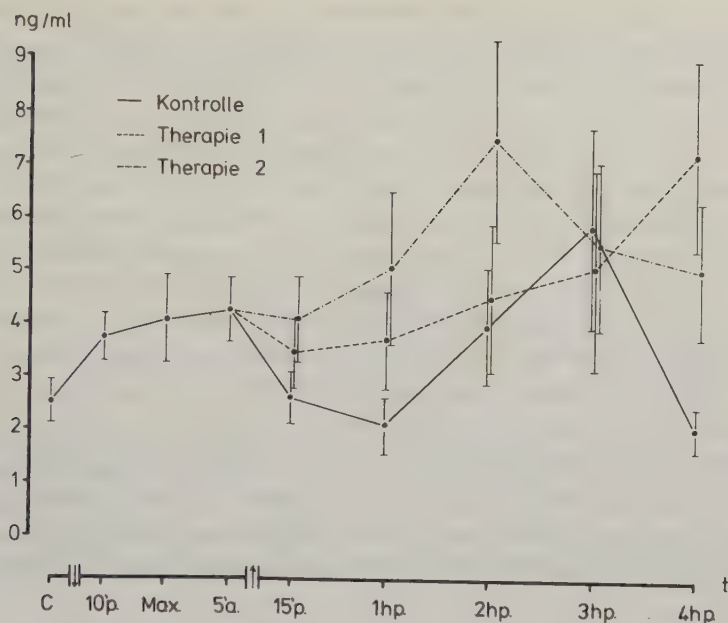


Abb.38 17-OH-Progesteron ( ng/ml ; MW  $\pm$  SEM ) bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock

Kontrolle: Keine Hormontherapie

Therapie 1 : 1 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion

Therapie 2 : 2 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion

Die Pfeile kennzeichnen Anfang und Ende der oligämischen Schockphase

### 3.2.1.3. Meßergebnisse: 17-OH-Progesteron

( Tab.23, 24, 25; Abb.35, 36, 37, 38 )

Die mittlere 17-OH-Progesteron-Konzentration im peripheren Plasma der Versuchstiere vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks beträgt  $2.50 \pm 0.44$  ( SEM ) ng/ml .

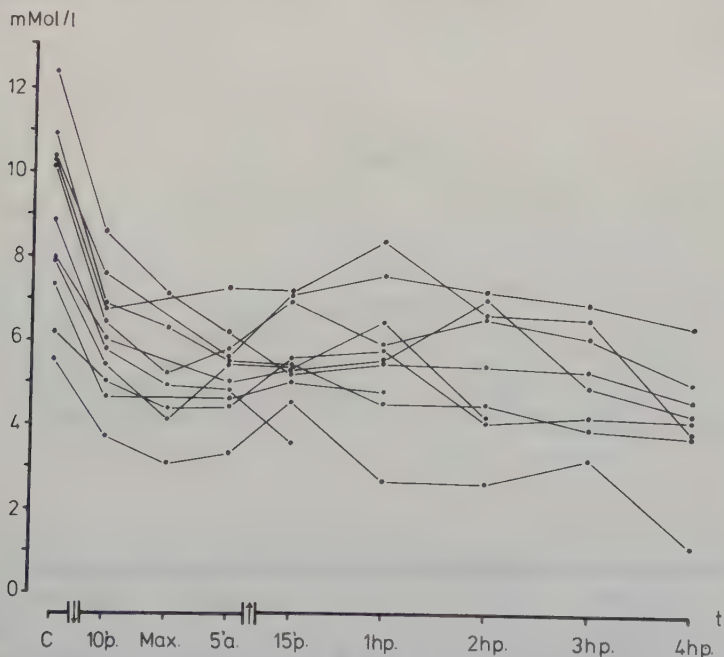
In Analogie zum Verhalten des Progesteron- und DOC-Spiegels während der Oligämie erhöht sich die mittlere 17-OH-Progesteron-Konzentration im peripheren Plasma der Versuchstiere während der Entblutung sprunghaft um ca. 50 % auf 3.75 ng/ml 10 min nach Entblutung (  $p < 0.025$ , Abb. 38 ). Im weiteren Verlauf der Oligämiephase steigt der 17-OH-Progesteron-Spiegel nur noch wenig an. 5 min vor Beginn der Rückblutung liegt er deutlich über dem Ausgangswert (  $p < 0.05$  ). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Plasmakonzentrationen von 17-OH-Progesteron 5 min vor Reinfusion und den individuellen Oligämiezeiten fehlt; dagegen ist die Beziehung dieser Werte zu den Überlebenszeiten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant positiv .

In der Kontrollgruppe ist mit der Reinfusion des extrakorporalen Blutvolumens ein deutlicher Abfall der 17-OH-Progesteron-Konzentration verbunden, der sich in der 1. Stunde nach Reinfusion fortsetzt. 3 h nach Rückblutung wird mit 5.92 ng/ml die in dieser Gruppe höchste mittlere 17-OH-Progesteron-Konzentration gemessen .

Das Verhalten des 17-OH-Progesterons in der Therapiegruppe 1 während der normovolämischen Phase ist charakterisiert durch einen kontinuierlichen Anstieg des Plasmaspiegels. 15 min nach Reinfusion ist er gegenüber dem Kontrollwert statistisch signifikant (  $p < 0.05$  ) erhöht. 4 h nach Reinfusion erreicht der Plasmaspiegel einen Peak, der etwa doppelt so hoch ist wie der Plasmaspiegel beim Maximum der Blutabgabe.

In der Therapiegruppe 2 folgt während der normovolämischen Phase des Schockversuchs einem initialen Abfall der Plasma-17-OH-Progesteron-Konzentration ein Anstieg bis zum Zeitpunkt 2 h nach Reinfusion; hier ist der 17-OH-Progesteron-Spiegel gegenüber dem Ausgangswert signifikant (  $p < 0.05$  ) erhöht; dann sinkt er neuerlich ab. Auffällige Beziehungen zwischen den jeweils letzten 17-OH-Progesteron-Meßwerten und den individuellen Überlebenszeiten der Tiere bestehen nicht.

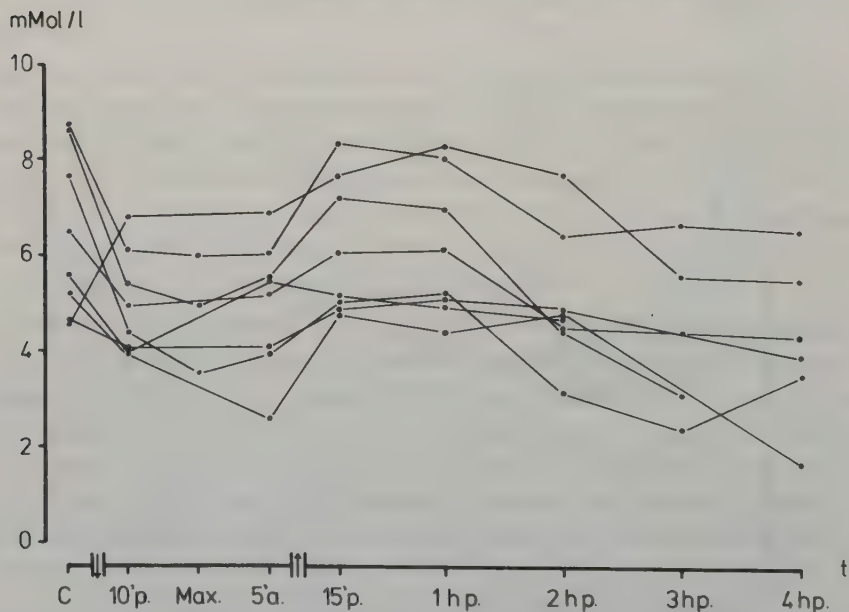
| Versuchstier vom: | Ktr.  | 10'n | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n | 2h n | 3h n | 4h n |
|-------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 26.03.73          | 7.33  | 4.64 |      | 4.64 | 5.05 | 4.86 |      |      |      |
| 14.05.73          | 10.34 | 6.76 |      | 7.26 | 7.18 | 8.38 | 6.69 | 6.57 | 3.88 |
| 15.05.73          | 7.94  | 5.47 | 4.14 | 5.47 | 5.40 | 6.46 | 4.18 |      |      |
| 18.05.73          | 6.23  | 5.02 | 4.41 | 4.48 | 5.59 | 5.81 | 4.07 | 4.26 | 4.18 |
| 28.05.73          | 7.94  | 6.04 |      | 5.02 | 5.40 | 5.62 | 7.03 | 4.98 | 4.29 |
| 03.07.73          | 11.89 | 6.80 | 6.31 | 5.55 | 5.43 | 4.52 | 4.52 | 3.95 | 3.76 |
| 05.07.73          | 8.89  | 5.78 | 4.98 | 4.86 | 3.57 |      |      |      |      |
| 06.07.73          | 10.22 | 6.46 | 5.24 | 5.81 | 6.95 | 5.99 | 6.65 | 6.12 | 5.02 |
| 24.07.73          | 12.39 | 8.59 | 7.11 | 6.26 | 5.24 | 5.51 | 5.47 | 5.36 | 4.64 |
| 01.08.73          | 10.30 | 7.56 |      | 5.62 | 7.18 | 7.56 | 7.22 | 6.99 | 6.42 |
| 07.08.73          | 5.51  | 3.72 | 3.12 | 3.34 | 4.52 | 2.70 | 2.66 | 3.23 | 1.14 |
| MW                | 9.00  | 6.07 | 5.04 | 5.29 | 5.59 | 5.74 | 5.39 | 5.18 | 4.17 |
| SD                | 2.23  | 1.37 | 1.34 | 1.01 | 1.12 | 1.58 | 1.61 | 1.33 | 1.49 |
| VK(%)             | 24.8  | 22.6 | 26.6 | 19.1 | 20.1 | 27.5 | 29.9 | 25.6 | 35.7 |



Tab.26 Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin (mMol/l)

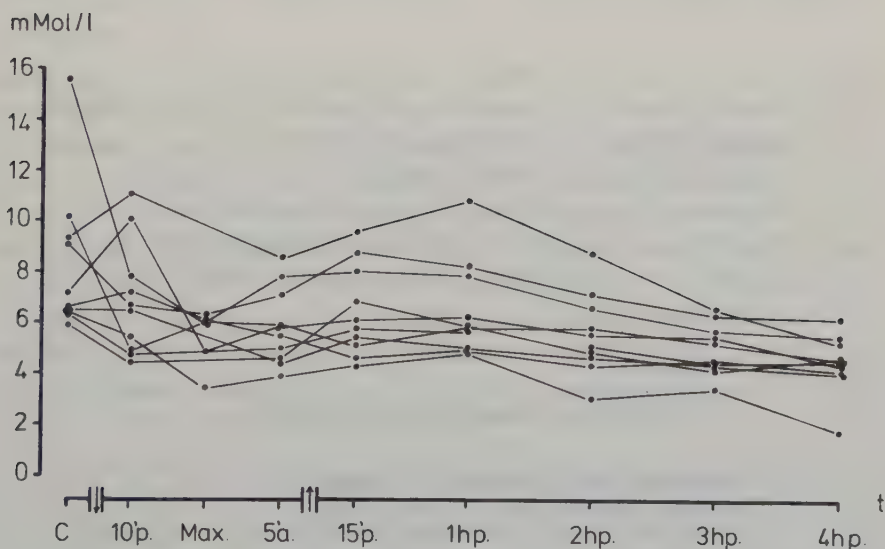
Abb.39 bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe (NaCl)

| Versuchstier vom: | Ktr. | 10'n | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n | 2h n | 3h n | 4h n |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 18.07.72          | 8.74 | 6.12 | 6.00 | 6.04 | 8.36 | 8.06 | 6.42 | 6.65 | 6.50 |
| 21.07.72          | 4.60 | 6.80 |      | 6.92 | 7.68 | 8.27 | 7.68 | 5.59 | 5.51 |
| 24.08.72<br>I     | 4.64 | 4.07 |      | 4.10 | 4.90 | 5.13 | 4.90 | 4.41 | 3.88 |
| 24.08.72<br>II    | 5.62 | 4.03 |      | 5.47 | 5.21 | 4.94 | 4.71 |      |      |
| 25.08.72          | 5.21 | 4.07 |      | 2.62 | 4.67 | 4.41 | 4.86 |      | 1.67 |
| 23.11.72          | 7.71 | 4.37 | 3.57 | 3.95 | 5.05 | 5.21 | 3.12 | 2.40 | 3.46 |
| 05.12.72          | 8.63 | 5.40 | 4.98 | 5.55 | 7.22 | 6.99 | 4.41 | 3.12 |      |
| 16.05.73          | 6.50 | 4.94 |      | 5.21 | 6.08 | 6.12 | 4.48 |      | 4.33 |
| MW                | 6.46 | 4.98 | 4.85 | 4.98 | 6.15 | 6.14 | 5.07 | 4.43 | 4.23 |
| SD                | 1.71 | 1.05 | 1.22 | 1.36 | 1.43 | 1.48 | 1.38 | 1.74 | 1.68 |
| VK(%)             | 26.5 | 21.1 | 25.2 | 27.3 | 23.2 | 24.0 | 27.3 | 39.2 | 39.7 |



Tab.27 Plasmakonzentrationen von G e s a m t c h o l e s t e r i n (mMol/l)  
Abb.40 bei den Versuchstieren der T h e r a p i e g r u p p e 1

| Versuchstier vom: | Ktr.  | 10'n  | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n  | 2h n | 3h n | 4h n |
|-------------------|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 20.07.72          | 6.38  | 4.75  |      | 5.02 | 5.89 | 5.78  | 5.13 | 4.67 | 4.64 |
| 01.12.72          | 9.01  | 6.73  | 6.35 | 7.11 | 8.85 | 8.40  | 7.30 | 6.46 | 6.35 |
| 06.12.72          | 10.22 | 4.90  | 6.00 | 7.90 | 8.09 | 7.98  | 6.76 | 5.81 | 5.59 |
| 07.12.72          | 7.18  | 10.03 | 4.86 | 5.97 | 6.16 | 6.35  | 5.62 | 5.55 | 4.60 |
| 09.01.73          | 5.97  | 4.45  |      | 4.67 | 6.95 | 5.93  | 5.09 | 4.29 | 4.71 |
| 10.01.73          | 6.61  | 6.52  |      | 4.56 | 5.51 | 5.05  | 4.94 | 4.37 | 4.26 |
| 28.03.73          | 9.27  | 11.02 |      | 8.63 | 9.73 | 10.94 | 8.78 | 6.69 | 5.36 |
| 22.05.73          | 6.46  | 5.40  | 3.38 | 3.91 | 4.33 | 4.86  | 3.04 | 3.53 | 1.82 |
| 04.07.73          | 10.79 | 7.18  | 6.19 | 5.55 | 4.52 | 4.90  | 4.37 | 4.56 | 4.22 |
| 09.07.73          | 15.58 | 7.83  | 6.16 | 5.97 | 5.17 | 5.81  | 5.97 | 5.43 | 4.64 |
| MW                | 8.78  | 6.88  | 5.49 | 5.93 | 6.52 | 6.60  | 5.70 | 5.13 | 4.62 |
| SD                | 2.94  | 2.23  | 1.17 | 1.53 | 1.84 | 1.95  | 1.61 | 1.01 | 1.18 |
| VK(%)             | 33.5  | 32.4  | 21.2 | 25.8 | 28.3 | 29.5  | 28.3 | 19.8 | 25.6 |



Tab.28 Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin (mMol/l)

Abb.41 bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2

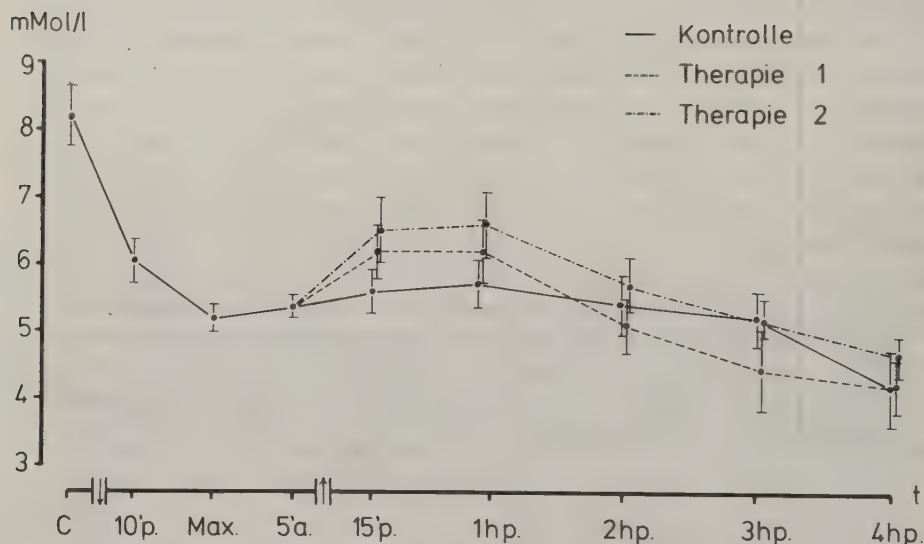


Abb.42 Gesamtcholesterin ( mMol/l ;  $MW \pm SEM$  ) bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock

Kontrolle: Keine Hormontherapie

Therapie 1 : 1 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion

Therapie 2 : 2 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion

Die Pfeile kennzeichnen Anfang und Ende der oligämischen Schockphase

### 3.2.2. ERGEBNISSE DER CHOLESTERINBESTIMMUNG

#### 3.2.2.1. Meßergebnisse: Gesamtcholesterin

( Tab.26, 27, 28; Abb.39, 40, 41, 42 )

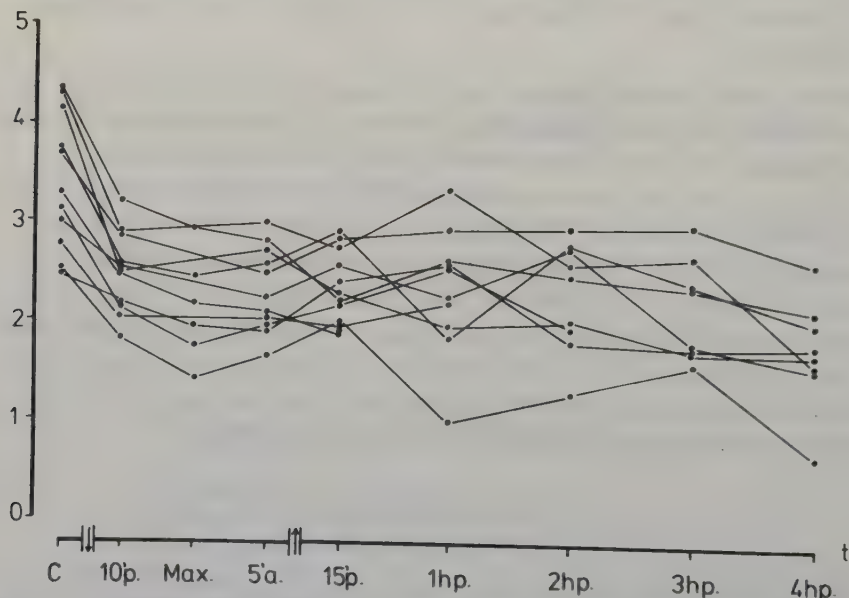
Die mittlere Gesamtcholesterin-Konzentration im peripheren Plasma der Hundewelpen vor Entblutungsbeginn beträgt  $8.22 \pm 0.47$  ( SEM ) ng/ml. Einheitliche Beziehungen der Einzelwerte zu Alter, Gewicht oder Geschlecht der Tiere lassen sich nicht finden.

Die oligämische Schockphase ist durch hochsignifikante Veränderungen im Plasmaspiegel des Gesamtcholesterins gekennzeichnet ( Abb.42 ). Bereits 10 min nach Ende der Entblutung ist der mittlere Plasmaspiegel ( 6.05 mMol/l ) deutlich unter den Ausgangswert abgesunken (  $p < 0.001$  ). Ein zwar verlangsamer, aber immer noch signifikanter Konzentrationsverlust ist zwischen dem Zeitpunkt 10 min nach Beginn der Entblutung und dem Maximum der Blutabgabe zu beobachten. Durch das in der zweiten Hälfte der Oligämiezeit vom Versuchstier aus dem Vorratsgefäß teilweise zurückgenommene relativ cholesterinreiche Blut stabilisiert sich der Plasmaspiegel des Gesamtcholesterins geringfügig. Dennoch ist er 5 min vor Reinfusion gegenüber dem Kontrollwert bzw. dem Meßwert 10 min nach Beginn der Entblutung noch signifikant (  $p < 0.001$  bzw.  $p < 0.02$  ) erniedrigt. Die Beziehungen zwischen den Cholesterin-Einzelwerten 5 min vor Beginn der Reinfusion und den individuellen Oligämie- bzw. Überlebenszeiten sind nicht einheitlich. Ebenso fehlt eine klare Korrelation zwischen den Mittelwerten für Gesamtcholesterin und dem Plasma- $\text{Ca}^{++}$  ( Steigerung der Membranpermeabilität für Cholesterin ! ) während der oligämischen Schockphase.

Zwischen dem letzten Meßwert der oligämischen und dem ersten in der normovolämischen Schockphase besteht in allen Gruppen ein deutlicher, aber nur in der Therapiegruppe 1 signifikanter (  $p < 0.01$  ) Anstieg des Plasma-Gesamtcholesterin-Spiegels. In der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe 2 werden die höchsten Gesamtcholesterin-Plasmakonzentrationen der Nachphase 1 h nach Reinfusion erreicht. Gleichmäßig in allen Gruppen fällt sodann die Plasmakonzentration des Gesamtcholesterins geringgradig bis mäßig ab und erreicht 4 h nach Reinfusion den tiefsten Wert. Er ist in allen Gruppen gegenüber dem Kontrollwert und dem Meßwert 15 min nach Reinfusion signifikant (  $p < 0.05$  ) erniedrigt.

| Versuchs-<br>tier vom: | Ktr. | 10'n | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n | 2h n | 3h n | 4h n |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 26.03.73               | 2.74 | 2.01 |      | 2.05 | 1.98 | 2.17 |      |      |      |
| 14.05.73               | 4.29 | 2.89 |      | 3.00 | 2.74 | 3.34 | 2.58 | 2.70 | 1.63 |
| 15.05.73               | 3.12 | 2.13 | 1.75 | 1.98 | 2.17 | 2.55 | 1.94 |      |      |
| 18.05.73               | 2.43 | 2.13 | 1.94 | 1.86 | 2.39 | 2.58 | 1.82 | 1.75 | 1.78 |
| 28.05.73               | 3.00 | 2.55 |      | 2.24 | 2.58 | 2.24 | 2.77 | 1.82 | 1.56 |
| 03.07.73               | 4.14 | 2.51 | 2.70 | 2.70 | 2.28 | 1.98 | 2.05 | 1.75 | 1.71 |
| 05.07.73               | 3.31 | 2.51 | 2.17 | 2.13 | 1.90 |      |      |      |      |
| 06.07.73               | 3.72 | 2.55 | 2.47 | 2.58 | 2.93 | 1.86 | 2.77 | 2.39 | 2.01 |
| 24.07.73               | 4.33 | 3.19 | 2.93 | 2.81 | 2.20 | 2.58 | 2.47 | 2.36 | 2.13 |
| 01.08.73               | 3.69 | 2.85 |      | 2.47 | 2.85 | 2.93 | 2.96 | 3.00 | 2.62 |
| 07.08.73               | 2.51 | 1.82 | 1.37 | 1.63 | 2.01 | 1.03 | 1.29 | 1.60 | 0.72 |
| MW                     | 3.39 | 2.47 | 2.19 | 2.31 | 2.37 | 2.33 | 2.29 | 2.17 | 1.77 |
| SD                     | 0.69 | 0.41 | 0.55 | 0.43 | 0.36 | 0.63 | 0.55 | 0.51 | 0.55 |
| VK(%)                  | 20.5 | 16.8 | 25.1 | 18.6 | 15.3 | 27.3 | 24.0 | 23.7 | 30.8 |

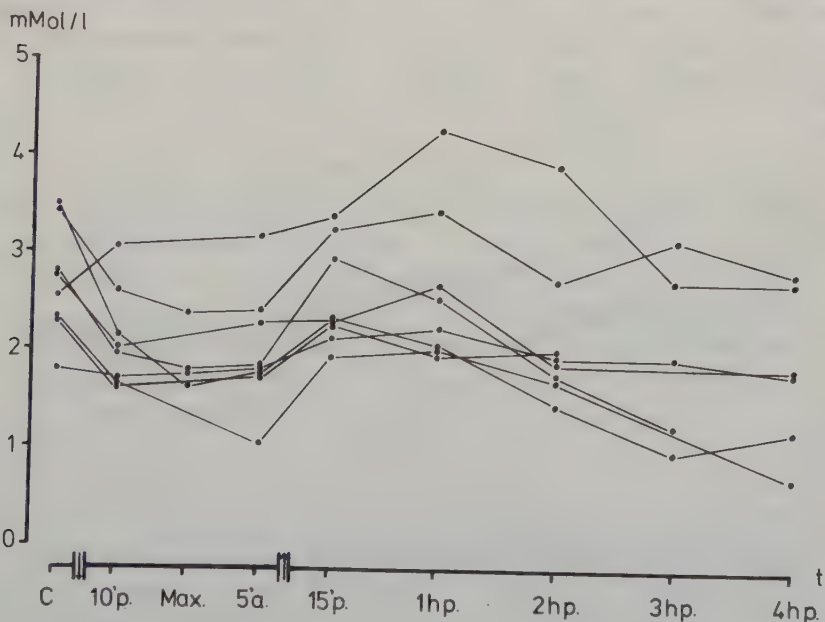
mMol/l



Tab.29 Plasmakonzentrationen von freiem Cholesterin (mMol/l)

Abb.43 bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe (NaCl)

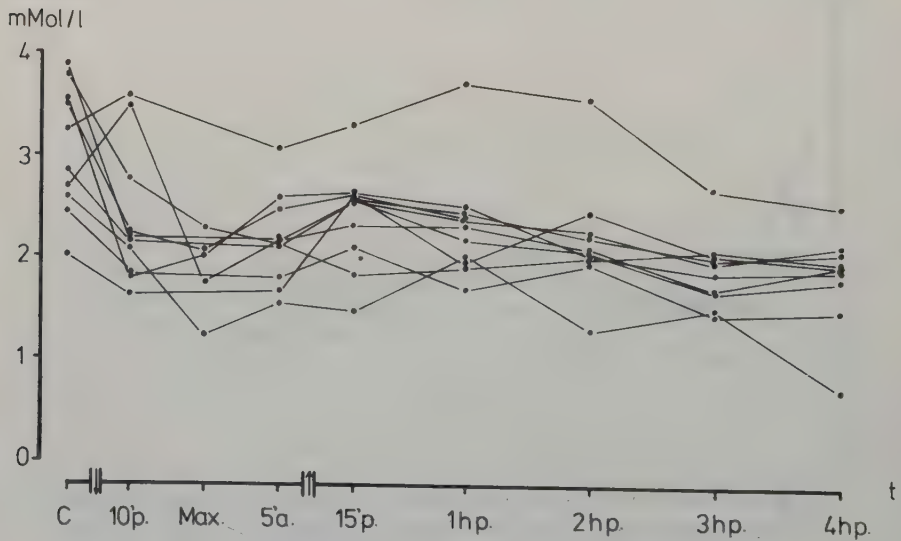
| Versuchs-<br>tier vom: | Ktr. | 10'n | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n | 2h n | 3h n | 4h n |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 18.07.72               | 3.42 | 2.62 | 2.36 | 2.43 | 3.27 | 3.46 | 2.74 | 3.19 | 2.85 |
| 21.07.72               | 2.55 | 3.08 |      | 3.19 | 3.38 | 4.29 | 3.95 | 2.77 | 2.74 |
| 24.08.72<br>I          | 1.82 | 1.67 |      | 1.82 | 2.13 | 2.24 | 1.98 | 1.98 | 1.82 |
| 24.08.72<br>II         | 2.32 | 1.63 |      | 1.79 | 2.28 | 1.98 | 2.05 |      |      |
| 25.08.72               | 2.32 | 1.63 |      | 1.06 | 1.94 | 2.05 | 1.44 | 0.99 | 1.22 |
| 23.11.72               | 3.50 | 2.13 | 1.63 | 1.82 | 2.36 | 2.05 | 1.44 | 0.99 | 1.22 |
| 05.12.72               | 2.77 | 1.98 | 1.75 | 1.86 | 2.96 | 2.55 | 1.75 | 1.25 |      |
| 16.05.73               | 2.77 | 2.05 |      | 2.28 | 2.32 | 2.66 | 1.90 |      | 1.82 |
| MW                     | 2.68 | 2.10 | 1.91 | 2.03 | 2.58 | 2.66 | 2.19 | 2.04 | 1.86 |
| SD                     | 0.57 | 0.52 | 0.39 | 0.62 | 0.54 | 0.82 | 0.80 | 0.95 | 0.83 |
| VK(%)                  | 21.2 | 24.7 | 20.5 | 30.5 | 21.1 | 30.8 | 36.8 | 46.5 | 44.7 |



Tab.30 Plasmakonzentrationen von f r e i e m Cholesterin (mMol/l)

Abb.44 bei den Versuchstieren der T h e r a p i e g r u p p e 1

| Versuchstier vom: | Ktr. | 10 <sup>n</sup> | Max. | 5 <sup>v</sup> | 15 <sup>n</sup> | 1h n | 2h n | 3h n | 4h n |
|-------------------|------|-----------------|------|----------------|-----------------|------|------|------|------|
| 20.07.72          | 2.85 | 2.17            |      | 2.13           | 2.55            | 2.39 | 2.24 | 1.98 | 2.13 |
| 01.12.72          | 3.53 | 2.24            | 2.17 | 2.47           | 3.08            | 2.96 | 2.47 | 2.05 | 1.94 |
| 06.12.72          | 3.53 | 1.79            | 2.05 | 2.62           | 2.62            | 2.51 | 2.01 | 1.86 | 1.90 |
| 07.12.72          | 2.70 | 3.53            | 1.75 | 2.20           | 2.32            | 2.32 | 2.09 | 1.71 | 1.94 |
| 09.01.73          | 2.01 | 1.63            |      | 1.67           | 2.62            | 2.20 | 2.09 | 1.71 | 1.82 |
| 10.01.73          | 2.47 | 1.84            |      | 1.82           | 2.13            | 1.67 | 1.94 | 1.44 | 1.48 |
| 28.03.73          | 3.27 | 3.57            |      | 3.08           | 3.31            | 3.72 | 3.57 | 2.70 | 2.51 |
| 22.05.73          | 2.58 | 2.17            | 1.25 | 1.56           | 1.48            | 2.01 | 1.33 | 1.52 | 0.72 |
| 04.07.73          | 3.76 | 2.77            | 2.28 | 2.13           | 1.82            | 1.94 | 2.01 | 2.09 | 1.98 |
| 09.07.73          | 3.91 | 2.17            |      | 2.13           | 2.55            | 2.39 | 2.24 | 1.98 | 2.13 |
| MW                | 3.06 | 2.45            | 1.94 | 2.18           | 2.39            | 2.40 | 2.22 | 1.95 | 1.82 |
| SD                | 0.63 | 0.69            | 0.38 | 0.46           | 0.56            | 0.58 | 0.57 | 0.39 | 0.47 |
| VK(%)             | 20.5 | 28.2            | 19.7 | 20.9           | 23.4            | 24.2 | 25.7 | 20.2 | 25.6 |



Tab.31 Plasmakonzentrationen von freiem Cholesterin (mMol/l)  
Abb.45 bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2

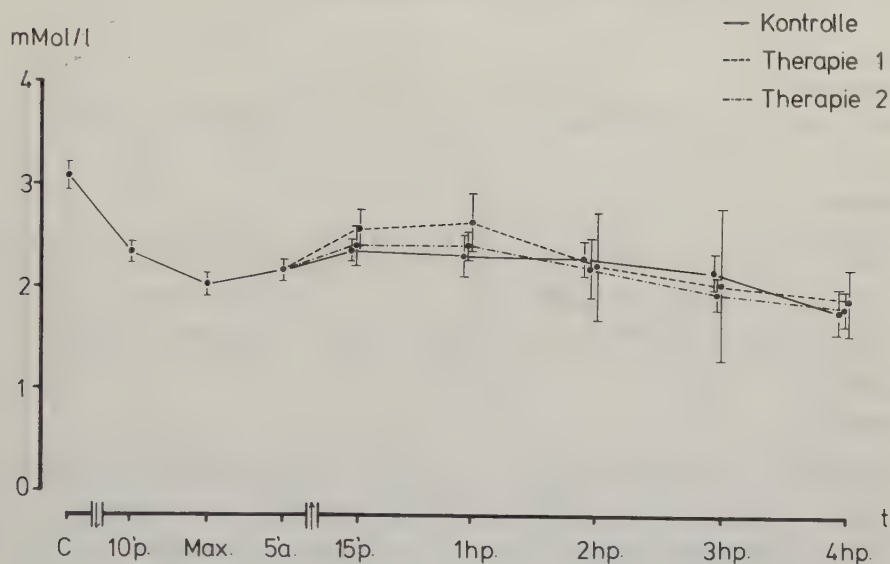


Abb. 46 Freies Cholesterin ( mMol/l ; MW  $\pm$  SEM ) bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock

Kontrolle: Keine Hormontherapie

Therapie 1 : 1 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion

Therapie 2 : 2 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion

Die Pfeile kennzeichnen Anfang und Ende der oligämischen Schockphase

### 3.2.2.2. Meßergebnisse: Freies und verestertes Cholesterin ( Tab. 29, 30, 31, 32; Abb. 43, 44, 45, 46, 47 )

Die mittlere Konzentration des freien Cholesterins im peripheren Plasma der Hundewelpen vor Entblutung beträgt  $3.08 \pm 0.13$  ( SEM ) mMol/l, die mittlere Konzentration des veresterten Cholesterins  $5.14 \pm 0.37$  ( SEM ) mMol/l. Zwischen den Ausgangswerten für freies Cholesterin und dem Alter der Tiere besteht eine negative Korre-

lation (  $p < 0.01$  ), d.h. je jünger die Tiere sind, desto höher ist der Kontrollwert des freien Cholesterins.

| Versuchs-<br>tiere der Ktr. 10°n Max. 5°v 15°n 1h n 2h n 3h n 4h n<br>Kontroll-<br>gruppe<br>( n=11 ) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| MW                                                                                                    | 5.61 | 3.61 | 2.85 | 2.98 | 3.22 | 3.42 | 3.09 | 3.01 | 2.40 |
| SD                                                                                                    | 1.57 | 0.98 | 0.81 | 0.64 | 0.81 | 1.03 | 1.07 | 0.85 | 0.96 |
| VK(%)                                                                                                 | 28.1 | 27.2 | 28.3 | 21.6 | 24.9 | 30.1 | 34.6 | 28.2 | 40.3 |
| Therapie-<br>gruppe 1<br>( n= 8 )                                                                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MW                                                                                                    | 3.77 | 2.88 | 2.94 | 2.95 | 3.57 | 3.48 | 2.88 | 2.40 | 2.36 |
| SD                                                                                                    | 1.30 | 0.59 | 0.89 | 0.86 | 0.92 | 0.79 | 0.66 | 0.80 | 0.89 |
| VK(%)                                                                                                 | 34.4 | 20.5 | 30.2 | 29.1 | 25.7 | 22.8 | 22.9 | 33.4 | 37.6 |
| Therapie<br>gruppe 2<br>( n=10 )                                                                      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MW                                                                                                    | 5.72 | 4.44 | 3.55 | 3.75 | 4.13 | 4.28 | 3.49 | 3.19 | 2.79 |
| SD                                                                                                    | 2.42 | 1.60 | 0.79 | 1.09 | 1.32 | 1.40 | 1.14 | 0.80 | 0.86 |
| VK(%)                                                                                                 | 42.3 | 36.1 | 22.3 | 29.2 | 32.0 | 33.3 | 32.6 | 25.1 | 30.9 |

Tab.32 Plasmakonzentrationen von v e r e s t e r t e m Cholesterolin (mMol/l) bei den Versuchstieren der K o n -  
t r o l l - und der T h e r a p i e gruppen 1 und 2

Die Oligämiephase des hämorrhagischen Schocks ist durch gegenüber dem Kontrollwert stark gesenkte Plasmakonzentrationen sowohl des freien wie des veresterten Cholesterins gekennzeichnet ( Abb.46 und 47 ). Die Differenz der Oligämie- zu den Kontrollwerten ist für beide Fraktionen des Plasmacholesterins zu jedem Zeitpunkt der Entblutungsphase hochsignifikant (  $p < 0.001$  ). Ein Zusammen-

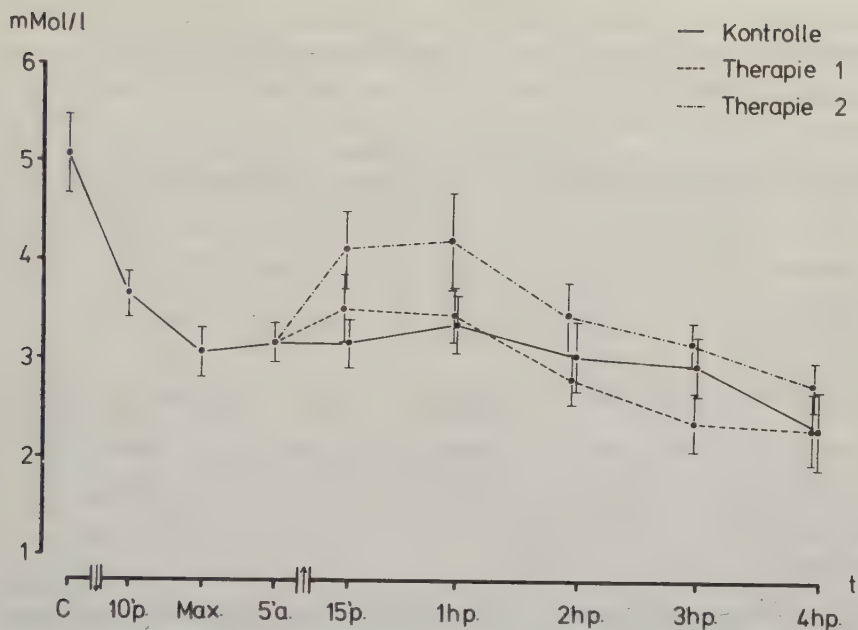


Abb.47 Verestertes Cholesterin ( mMol/l ; MW  $\pm$  SEM ) bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock  
 Kontrolle: Keine Hormontherapie  
 Therapie 1 : 1 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion  
 Therapie 2 : 2 mg/kg x h d-Aldosteron nach Reinfusion  
 Die Pfeile kennzeichnen Anfang und Ende der oligämischen Schockphase

hang zwischen den Plasmakonzentrationen des freien Cholesterins 5 min vor Reinfusion und den individuellen Oligämie- bzw. Überlebenszeiten der Welpen ist nicht erkennbar.

Durch die Reinfusion des relativ cholesterinreichen extrakorporalen Blutes erhöht sich kurzzeitig in allen Gruppen die mittlere Plasmakonzentration von freiem und verestertem Cholesterin, um im Verlauf der normovolämischen Schockphase wieder abzusinken. Bei der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe 2 sind sämtliche Werte für freies Cholesterin in der Nachphase gegenüber dem Kon-

| Versuchs-<br>tiere der Ktr. 10'n Max. 5'v 15'n 1h n 2h n 3h n 4h n<br>Kontroll-<br>gruppe<br>( n=11 ) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| MW                                                                                                    | 38.2 | 41.2 | 43.6 | 43.9 | 42.9 | 40.7 | 48.4 | 42.4 | 44.6 |
| SD                                                                                                    | 3.2  | 3.6  | 1.8  | 3.5  | 4.3  | 4.5  | 3.4  | 3.7  | 8.1  |
| VK(%)                                                                                                 | 8.3  | 8.7  | 4.3  | 7.9  | 10.1 | 11.0 | 7.9  | 8.7  | 18.2 |
| Therapie-<br>gruppe 1<br>( n= 8 )                                                                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MW                                                                                                    | 42.5 | 42.1 | 40.0 | 40.9 | 42.2 | 43.1 | 42.7 | 44.8 | 44.3 |
| SD                                                                                                    | 6.7  | 3.6  | 5.3  | 5.3  | 2.8  | 4.7  | 4.8  | 4.1  | 5.4  |
| VK(%)                                                                                                 | 15.7 | 8.6  | 13.3 | 13.0 | 6.7  | 10.9 | 11.2 | 9.2  | 12.2 |
| Therapie-<br>gruppe 2<br>( n=10 )                                                                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MW                                                                                                    | 36.1 | 36.2 | 35.3 | 37.3 | 37.2 | 36.8 | 39.6 | 38.4 | 39.9 |
| SD                                                                                                    | 5.0  | 4.7  | 1.5  | 2.8  | 3.3  | 3.4  | 4.9  | 5.9  | 5.7  |
| VK(%)                                                                                                 | 13.8 | 13.0 | 4.2  | 7.6  | 9.0  | 9.3  | 12.4 | 15.4 | 14.2 |

Tab.33 Plasmaquotienten ( % )

Freies Cholesterin

Gesamt cholesterin

bei den Versuchstieren der K o n t r o l l gruppe (NaCl)  
und der T h e r a p i e gruppen 1 und 2

trollwert signifikant (  $p < 0.01$  ) gesenkt, bei der Therapiegrup-  
pe 1 lediglich der Meßwert 4 h nach Reinfusion (  $p < 0.05$  ). Ähn-  
lich verhält sich das veresterte Cholesterin. In der Kontroll -  
gruppe und der Therapiegruppe 2 ist außerdem die Senkung des  
freien Cholesterins während der normovolämischen Schockphase,  
d.h. die Differenz zwischen den Meßwerten 15 min und 4 h nach En-  
de der Rückblutung, signifikant (  $p < 0.02$  bzw.  $p < 0.01$  ). Nur an-

gedeutet (  $p < 0.10$  ) existiert bei den Tieren der Therapiegruppe 2 eine negative Korrelation zwischen dem freien Plasmacholesterin 4 h nach Reinfusion und den individuellen Überlebenszeiten. Es läßt sich also nur mit Vorbehalt daraus folgern, daß die mit 2 mg/kg x h d-Aldosteron behandelten Hundewelpen um so länger überleben, je stärker der Plasmaspiegel des freien Cholesterins bis Versuchsende abgesunken ist.

| Versuchstiere der Kontrollgruppe<br>( n=11 ) | Ktr. | 10'n | Max. | 5'v  | 15'n | 1h n | 2h n | 3h n | 4h n |
|----------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| MW                                           | 62.1 | 70.7 | 77.3 | 78.9 | 76.1 | 69.4 | 77.3 | 74.1 | 84.9 |
| SD                                           | 8.8  | 10.9 | 6.0  | 10.8 | 14.9 | 12.4 | 10.6 | 12.2 | 36.1 |
| VK(%)                                        | 14.2 | 15.5 | 7.8  | 13.7 | 19.6 | 17.9 | 13.7 | 16.5 | 42.5 |
| Therapiegruppe 1<br>( n= 8 )                 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MW                                           | 76.1 | 73.2 | 67.7 | 70.4 | 73.4 | 76.7 | 75.6 | 81.8 | 78.0 |
| SD                                           | 22.5 | 11.3 | 15.1 | 14.6 | 8.5  | 15.5 | 15.3 | 13.6 | 15.1 |
| VK(%)                                        | 29.6 | 15.4 | 22.4 | 20.7 | 11.6 | 20.2 | 20.2 | 16.6 | 19.3 |
| Therapiegruppe 2<br>( n=10 )                 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MW                                           | 57.2 | 60.5 | 55.0 | 59.7 | 59.6 | 58.7 | 66.3 | 63.6 | 67.6 |
| SD                                           | 11.9 | 10.8 | 3.2  | 7.4  | 8.6  | 8.6  | 12.9 | 15.5 | 15.8 |
| VK(%)                                        | 20.9 | 17.9 | 5.7  | 12.4 | 14.5 | 14.6 | 19.4 | 24.3 | 4.9  |

Tab.34 Plasmaquotienten ( % )

Freies Cholesterin

Verestertes Cholesterin

bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe (NaCl)  
und der Therapiegruppen 1 und 2

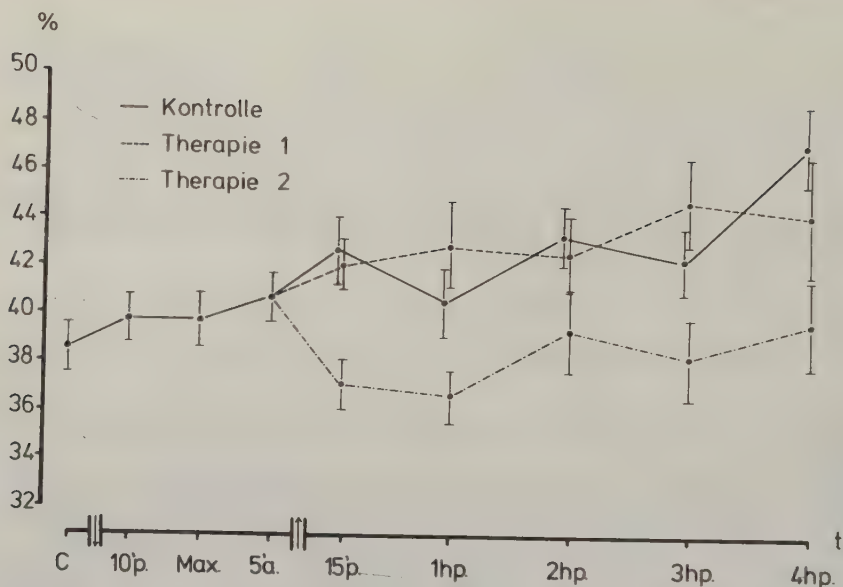
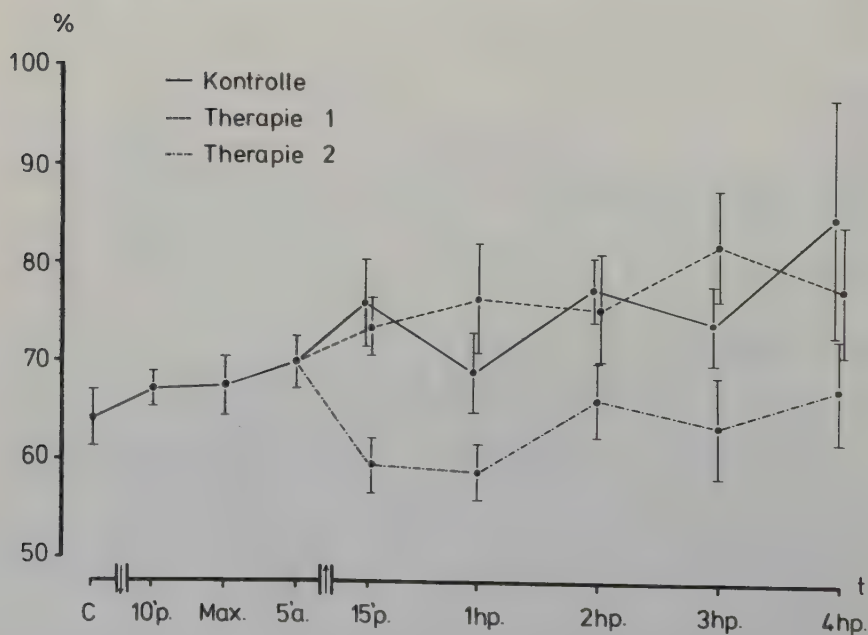


Abb. 48 Cholesterinquotienten ( oben : Frei / Gesamt ; unten : Frei / Verestert ) bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock  
Legende siehe Abb. 47



### 3.2.2.3. Meßergebnisse: Cholesterinquotienten

( Tab.33, 34 ; Abb. 48 )

Der Kontrollwert für den Quotienten Freies Cholesterin/Gesamt - cholesterin beträgt  $38.6 \pm 1.0$  ( SEM ) %, für den Quotienten Freies Cholesterin/Verestertes Cholesterin  $64.3 \pm 3.0$  ( SEM ) %. Während der oligämischen Schockphase werden gegenüber den Kontrollwerten leicht erhöhte, jedoch nicht signifikant veränderte Mittelwerte der beiden Quotienten gemessen ( Abb.48 ).

Durch die Reinfusion werden die Cholesterinquotienten in allen Gruppen nur unwesentlich und uneinheitlich verändert. Beide Quotienten erreichen in allen Gruppen nach unregelmäßigem Werteverlauf in der ersten Hälfte der normovolämischen Schockphase die höchsten Werte gegen Ende des Versuchs ( 3 h bzw. 4 h nach Ende der Reinfusion ). Doch nur der Quotient Freies/Verestertes Cholesterin in der Kontrollgruppe ist an den Meßpunkten 2 h, 3 h und 4 h nach Reinfusion signifikant ( $p < 0.05$ ) gegenüber dem Kontrollwert erhöht.

## 4. DISKUSSION

4.1. DISKUSSION DES METHODISCHEN VORGEHENS UND DER  
METHODENPRÜFUNG

## 4.1.1. DISKUSSION DER ARBEITSWEISE BEI ANSATZ UND EXTRAKTION

Einer der großen Vorteile radioimmunologischer Steroidbestimmungen besteht darin, daß die Messungen mit kleinen Probenvolumina durchgeführt werden können. Bei Plasma-Radioimmunoassays sind Einsatzvolumina unter 1 ml die Regel. In den hier beschriebenen Hormonassays wird vom Normeinsatzvolumen von 0.250 ml Plasma nur dann abgewichen, wenn ( in seltenen Fällen ) nicht genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht oder aus vorangegangenen Messungen bekannt ist, daß die in 0.250 ml Plasma enthaltenen Hormonmengen so hoch sind, daß sie mit der RIA-Standardkurve nicht erfaßt werden können .

Zwischen kleinen Probenvolumina und dem Extraktionsmittel wird nach dem Ausschütteln und Zentrifugieren oftmals keine deutliche Grenzlinie erkennbar. Um die Schwierigkeiten, die sich daraus für das Absetzen der wäßrigen ( plasmatischen ) von der organischen ( Extraktionsmittel - ) Phase ergeben, auszuschalten, werden sämtliche Plasmavolumina einheitlich mit Aqua dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 1.0 ml aufgegossen. Diese Maßnahme gewährleistet eine scharfe, gut sichtbare Trennung der beiden Phasen.

Die Mehrzahl der Messungen, deren Ergebnisse hier vorliegen, ist im Mai und Juni 1975, also zwei bis drei Jahre nach Gewinnung des Untersuchungsmaterials ( Juli 1972 bis August 1973 ) durchgeführt worden. Die Plasmaproben sind in tiefgekühltem Zustand aufbewahrt und jeweils zur Materialentnahme kurz aufgetaut worden. Unter diesen Lagerungsbedingungen sind Plasmasteroide über Jahre chemisch stabil ( 253 ).

Zuverlässige Direktbestimmungen von Steroidhormonen aus Blutplasma sind im Radioimmunoassay trotz der großen Spezifität der heute verwendeten Antikörper kaum möglich. Ein oder mehrere Extraktions- und Reinigungsschritte sind daher vor den meisten RIA obligat. Es ist versucht worden, mit möglichst spezifischen Extraktionsmitteln das zu bestimmende Steroid so selektiv zu extrahieren, daß

man auf eine anschließende Reinigung verzichten kann. Die Resultate dieser Experimente sind jedoch nicht eindeutig und nur in beschränktem Umfang reproduzierbar ( siehe unten ).

Dichlormethan, das bei der hier beschriebenen, in zwei identische Schritte gegliederten Plasmaextraktion verwendet wird, ist als Extraktionsmittel in der Steroidanalytik weit verbreitet. Durch Ausschütteln mit Dichlormethan werden die meisten NNR-Steroide zu einem gleichmäßig hohen Prozentsatz aus dem Plasma extrahiert. Dabei werden sowohl der freie Steroidanteil als auch, da Dichlormethan die steroidbindenden Proteine entfernt, die proteingebundene Fraktion ins Extraktionsmittel überführt. Voraussetzung für gute Extraktionsergebnisse ist ein Volumenverhältnis Extraktionsmittel / Plasma von mindestens 10 ( 48, 205 ). Das hier gewählte Verhältnis von 20 : 1 ( 5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : 0.250 ml Plasma ) kann als optimal gelten.

Die Wahl von Dichlormethan als Extraktionsmittel hat für das methodische Vorgehen bei der chromatographischen Isolierung von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron Konsequenzen. Da sämtliche polaren Corticosteroide, vor allem Cortisol, neben Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron im Dichlormethan-Extrakt enthalten sind, die Sephadex LH 20 - Chromatographie mit dem Laufmittel Heptan : Chloroform : Äthanol : Wasser aber nur für die Auftrennung der wenig polaren Steroide geeignet ist, ist es notwendig, zwischen Extraktion und ( 2. ) Chromatographie einen Reinigungsschritt einzuschalten, der die störenden Substanzen aus dem Extrakt entfernt. Diesem Zweck dient die ( 1. ) Chromatographie mit Sephadex LH 20 - Gel und dem Laufmittel Dichlormethan : Methanol ( 98 : 2 ).

Eine naheliegende Alternative, nämlich durch Verwendung spezifischer Extraktionsmittel den intermediären Reinigungsschritt zu ersetzen, hat sich bei Überprüfung als nicht sinnvoll erwiesen. Mit Petroläther, der von JOHANNSSON ( 183, 184 ) als Extraktionsmittel für Progesteron verwendet wird, werden zwar höhersubstituierte Steroidhormone nur zu einem geringen Prozentsatz ( eigene Wiederfindungsergebnisse nach doppelter Petrolätherextraktion : Corticosteron 2.0 % ; Aldosteron 0.7 % ; Cortison 3.9 % ; Cortisol 0.3 % ) aus dem Plasma extrahiert, dafür aber liegen die Wiederfindungsraten für die dem Progesteron chemisch nahe stehenden

Steroide DOC und 17-OH-Progesteron deutlich niedriger ( Tab.6 ) als bei Extraktion mit Dichlormethan. Außerdem verlangt die Extraktion mit Petroläther die Verwendung eines nur in beschränktem Umfang erhältlichen niedrigsiedenden Petroläthers und ein rigoros standardisiertes methodisches Vorgehen. Hexan, das CASTRO et al. ( 61 ) zur Extraktion von Progesteron vorschlagen, erweist sich zwar als Extraktionsmittel für Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron ( Tab.6 ) dem Petroläther insgesamt überlegen, doch die Wiederfindungsraten der Dichlormethanextraktion werden damit nicht erreicht. Durch die vorzüglichen Eigenschaften von Dichlormethan als Extraktionsmittel für Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron ist der Aufwand, der mit der zusätzlich erforderlichen Chromatographie verbunden ist, also zu rechtfertigen.

In der Absicht, damit eine Quelle positiver Blanks in Proteinbindungs- und Radioimmunoassays auszuschalten, versuchen einige Autoren ( 131, 132, 176 ) nachträglich aus Dichlormethan-Extrakten die Lipidsubstanzen zu entfernen. Unter den zu diesem Zweck entwickelten Methoden erweisen sich vor allem Verteilungsverfahren, z.B. die Verteilung zwischen Methanol und n-Hexan als sinnvoll. Da bei der hier beschriebenen radioimmunologischen Methode eine Reihe anderer Maßnahmen getroffen ist, um Blanks zu eliminieren, und weil mit einer weiteren Reinigung ein zusätzliches Wiederfindungsdefizit verbunden wäre, wird auf diese Maßnahme verzichtet.

#### 4.1.2. DISKUSSION DER ARBEITSWEISE BEI DER FLÜSSIGKEITS - SÄULENCHROMATOGRAPHIE

##### Theoretische Betrachtungen zum Elutionsmuster

Die Moleküle der NNR-Steroide werden bei der Flüssigkeitssäulenchromatographie mit Sephadex LH 20 - Gel in der Reihenfolge ihrer Polarität eluiert. Diese Elutionsregel findet sich in zahlreichen Untersuchungen bestätigt. Wie die verschiedenen Laufmittelkombinationen am Zustandekommen der Elutionsmuster beteiligt sind und in welchem Umfang die Effekte von Gelfiltration, Adsorption und Verteilung zum unterschiedlichen Verhalten der Steroidhormone während der Gelbettpassage beitragen, ist jedoch nicht vollständig geklärt.

Betrachtet man das Elutionsmuster von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron in der 1. Chromatographie, so ist die entscheidende Frage, warum die Moleküle des ( an C 21 ) monohydroxylierten Steroids DOC ( MG: 330.47 ) praktisch gleichzeitig mit denen des Progesterons ( MG: 314.47 ), das keine Hydroxylgruppe besitzt, aber deutlich eher als die des ebenfalls ( an C 17 ) monohydroxylierten Steroids 17-OH-Progesteron ( MG: 330.47 ) eluiert werden. Die Identität der Molekulargewichte von DOC und 17-OH-Progesteron schließt eine Molekularsiebwirkung des Gels ( Gelfiltration ) , die Polarität der Laufmittelkomponenten schließt Adsorptionseffekte aus. Die offenbar dominierenden Verteilungseffekte müssen auf die unterschiedliche Polarität der Hydroxymethylgruppe des DOC und der alpha-ständigen freien Hydroxylgruppe des 17-OH-Progesterons zurückgeführt werden. Das stärker polare 17-OH-Progesteron-Molekül dringt mit dem polaren Laufmittel in die Sephadexpartikel ein und wird dort nur langsam wieder freigegeben. Progesteron und DOC werden dagegen von Sephadex LH 20 kaum retiniert.

Bei der Chromatographie mit Laufmittel 2, das erstmals 1970 zur Steroidseparation verwendet ( 253 ) und wenig später auch bei der Trennung von Prostaglandin-Methylestern eingesetzt wird ( 9 ), sind die Verteilungseffekte noch stärker ausgeprägt. Heptan, das keine Wasserstoffbindungen knüpft, reichert sich in der mobilen Phase, Chloroform, das Wasserstoffbindungen eingeht und dabei als Protonendonator wirkt, in der stationären Phase des Elutionssystems an. Das unterschiedliche Verhalten der beiden Hauptkomponenten von Laufmittel 2 macht die Trennresultate plausibel; Progesteron wird rasch mit der unpolaren Heptan-Phase eluiert, DOC und 17-OH-Progesteron dringen in die Sephadex-Partikel ein. Wegen seiner größeren Polarität wird aber 17-OH-Progesteron erst später als DOC eluiert .

#### Die Spezifität der chromatographischen Reinigung

Jede säulenchromatographische Trennung läßt sich, bei sonst unveränderten Bedingungen, durch die Verlängerung des Gelbetts verbessern. Dabei müssen jedoch längere Elutionszeiten in Kauf genommen werden .

MURPHY ( 253 ) empfiehlt in ihrer Originalarbeit über die Auftrennung von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron eine Gelhöhe von 31 cm. Dabei treten allerdings noch geringfügige Überschneidungen zwischen den Randfraktionen der Hormoneluutionsprofile auf. Um diese Interferenzonen zu eliminieren, ist bei den hier geschilderten Versuchen die Gelhöhe geringfügig, nämlich um sechs cm, auf 37 cm verlängert. Eine unökonomisch verlängerte Elutionszeit ist damit nicht verbunden.

Eine nur unvollständige Antwort läßt sich auf die Frage geben, wie stark Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron nach der chromatographischen Isolierung noch durch andere Steroids-substanzen, die im anschließenden RIA stören könnten, kontaminiert sind. Aus den eigenen experimentellen Daten ist bekannt, daß Androstendion fast vollständig zusammen mit Progesteron eluiert wird und daß zwischen 17-OH-Progesteron und Testosteron eine partielle chromatographische Interferenz besteht. Innerhalb des Progesteron-Elutionsprofils werden außerdem 5alpha - und 5beta - pregnan - 3,20 - dion eluiert ( 118 ). Da diese Steroide im peripheren Plasma keine meßbaren Konzentrationen besitzen ( 1 ), ist ihre Interferenz bei der Elution ohne Bedeutung. Aufmerksamkeit verdienen dagegen die Beobachtungen, daß zusammen mit DOC 20alpha - und 20beta - dihydro - progesteron ( 254, 388 ) und zusammen mit 17-OH-Progesteron 11-dehydro-corticosteron ( Compound A ) eluiert werden ( 254 ). Nach FLORENSA et al. ( 108 ) ist der Plasmaspiegel von 20alpha - dihydro - progesteron bei Frauen in der Follikelphase und bei Männern zwei bis drei Mal so hoch wie der des DOC; bei Graviden ist diese Relation noch höher. Die Ausscheidung von 11-dehydro - corticosteron im Urin Erwachsener beträgt 10 ng / 24 h, die des Metaboliten Tetrahydro - 11 - dehydro-corticosteron 160 ng / 24 h ( 71 ). Zuverlässige Rückschlüsse auf die Plasmakonzentration von Compound A lassen sich aus diesen Meßwerten nicht ziehen. Über die Plasmakonzentrationen von 20alpha - dihydro - progesteron und 11 - dehydro - corticosteron bei jungen Hunden ist nichts bekannt.

## Die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Reinigung

Wesentlichen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Reinigung haben Volumen und Viskosität der Probe, die Umgebungstemperatur und die Flußrate des Laufmittels.

Eine chromatographische Reinigung ist umso zuverlässiger reproduzierbar, je kleiner das Volumen der Probe und je enger damit die Startzone ist. Das bei beiden Chromatographien gleiche Probenvolumen von 0.500 ml ( 2 x 0.250 ml, in denen der Steroidextrakt gelöst ist ) macht nur etwa 2 % des jeweiligen Gelbettvolumens ( 25.5 ml bzw. 23.5 ml ) aus und liegt damit im optimalen Bereich. Laufmittel und gelöster Plasma-Steroidextrakt sind bei den äußerst niedrigen Konzentrationen der NNR-Steroide im peripheren Plasma in ihrer Viskosität kaum verschieden. Die kritische

Größe  $\frac{\text{Viskosität der Probe}}{\text{Viskosität des Laufmittels}}$  hat annähernd den idealen Wert

von 1. Als Ursache für die Verbreiterung der Elutionszonen kommt die Viskosität der Probe daher nicht in Betracht.

Bei Arbeit im gekühlten Labor ( 18° C ) lassen sich die Elutionsmuster beider Chromatographien etwas besser reproduzieren als bei Zimmertemperatur ( 22° C ). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer experimenteller Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit chromatographischer Verfahren ( 254 ). Wichtiger als der absolute Wert ist für die Reproduzierbarkeit der Elutionen jedoch die Konstanz der Umgebungstemperatur. Sind die Temperaturschwankungen gering, so können auch in ungekühlten Räumen die Elutionsmuster lange Zeit exakt reproduziert werden.

Der Elutionsdruck und damit die Flowrate bei der Flüssigkeitssäulenchromatographie hängen ab von der hydrostatischen Druckdifferenz zwischen der freien Oberfläche des Laufmittels und dem Auslaßniveau der Säule ( d.i. die Höhe der Fritte ). Bei der 1. Chromatographie wird der Elutionsflow in Schwerkraftrichtung dadurch konstant gehalten, daß aus dem Vorratsgefäß stets nur soviel Laufmittel nachtropft wie zur gleichen Zeit die Säule verläßt. Bildet sich über dem Gelbett ein Laufmittel-Überstand, so

steigt der Elutionsdruck an. Werden in dieser Situation Zu- und Abfluß nicht rasch wieder aufeinander eingestellt, so sinkt die Qualität der Reproduktion des Elutionsmusters.

Im Unterschied dazu besteht bei der 2. Chromatographie eine " Autoregulation " von Elutionsdruck und Flowrate, auf die nach dem Start der Säulen kein Einfluß mehr genommen werden kann. Initial, nach dem Füllen der Vorratsgefäße, sind Elutionsdruck und Flow - rate maximal, um dann während der Chromatographie kontinuierlich mit dem sinkenden Laufmittelvolumen abzunehmen. Da diese Veränderungen in der Elutionskinetik jedoch für jede Säule und bei jedem Elutionsvorgang gleich sind, ist die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Reinigungen dadurch nicht beeinträchtigt . Die zu trennenden Substanzen werden im Gegenteil, vor allem in der zweiten Hälfte der Elution, durch die gesenkte Flowrate in relativ engen Grenzen und mit großer Einheitlichkeit eluiert .

#### Die Praktikabilität der chromatographischen Reinigung

Die besonderen Kennzeichen der dargestellten Doppelflüssigkeits-säulenchromatographie zur exakten Auftrennung von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron sind der relativ geringe Materialaufwand und ihre Durchführbarkeit im " Einmannbetrieb ".

Selbst wenn statt sechs gleichzeitig acht Säulen einer Garnitur eluiert werden, kann eine Person alle nötigen Handgriffe ausführen. Am meisten trägt dazu die Verwendung der kalibrierten Vorratsgefäße bei. Die 2. Chromatographie läßt sich darüberhinaus von der 1. Chromatographie abkoppeln und kann dann in alle Elutionssysteme für NNR-Steroide integriert werden, durch die Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron zwar im " Pool " von den übrigen Corticosteroiden separiert werden, bei denen aber eine Isolierung und Reinigung der drei nahe verwandten Hormone nicht möglich ist ( 130 ).

## 4.1.3. DISKUSSION DER ARBEITSWEISE BEIM RADIOIMMUNOASSAY

## Die Technik der Sättigungsanalyse

Das hier dargestellte sättigungsanalytische Verfahren beruht auf der sog. Gleichgewichtstechnik ( 95 , 426 ) : Stummes und markiertes Antigen werden gleichzeitig mit dem Antikörper zur Reaktion gebracht. Die Inkubationstemperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  beschleunigt die Einstellung des Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Antigen. Die Produkte dieser ( 1. ) Gleichgewichtseinstellung sind  $\text{AgAK}$  und  $^{+}\text{AgAK}$ ; der Antikörper ist gesättigt. In der anschließenden ( 2. ) Gleichgewichtsreaktion zwischen freiem und markiertem Antigen mit dem Adsorbens liegt das Gleichgewicht so weit auf der rechten Seite, daß nahezu alles ungebundene Antigen aus dem Inkubationsmedium entfernt wird.

Im Gegensatz zum Verfahren bei der Gleichgewichtstechnik wird bei der " sequentiellen " Sättigungstechnik ( 427 ) zunächst lediglich das stumme Antigen mit dem Antikörper inkubiert. Nach dieser 1. Inkubationsperiode ist, da die Konkurrenz des Tracers fehlt, das gesamte stumme Antigen an den Antikörper gebunden, der Antikörper selbst aber erst teilgesättigt. Die noch freien AK-Bindungsstellen werden in einer 2. Inkubationsperiode mit markiertem Antigen besetzt. Dieses Verfahren zeichnet sich vor der Gleichgewichtstechnik durch eine etwas größere Sensitivität und nahezu lineare Dosis-Antwort-Kurven in den mittleren Meßbereichen aus. Zeitlich und technisch ist es jedoch aufwendiger, da die Antigen-Antikörper-Reaktionen in zwei konsekutiven Inkubationsperioden stattfinden, deren zweite für alle Proben von exakt gleicher Dauer sein muß, weil sonst die Gefahr unterschiedlicher Redissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes besteht.

Das Ergebnis der Sättigungsreaktion ist bei beiden Verfahrenstechniken gleich. Denn, da die Reaktionen zwischen den Bindungspartnern in einer Sättigungsanalyse dem Massenwirkungsgesetz folgen, ist die Massenwirkungskonstante, d.h. der Quotient aus dem Produkt der molaren Konzentration der Endstoffe und dem Produkt der molaren Konzentration der Ausgangsstoffe, unabhängig vom initialen Mischungsverhältnis der Reaktionspartner.

### Das Kohle-Adsorptionsverfahren

Dextran-Kohle-Suspension als Mittel zur Trennung von freiem und gebundenem Antigen ist vor anderen Adsorbenten vor allem durch die relativ konstante Adsorptionsfähigkeit, ihr technischer Einsatz durch das hohe Arbeitstempo ausgezeichnet ( 48 ). Daraus mag sich die weite Verbreitung des Kohle-Adsorptionsverfahrens in der RIA-Technik erklären. Doch das Verfahren ist nicht komplikationslos. Vornehmlich zwei Störfaktoren, die die Zuverlässigkeit des RIA beeinträchtigen können, sind bei der Verwendung von Dextran-Kohle-Suspension zu beachten. Im hier beschriebenen Meßverfahren werden sie durch geeignete Maßnahmen ausgeschaltet bzw. reduziert:

1. Werden hochverdünnte Antisera mit entsprechend niedrigem Gesamtproteingehalt verwendet, besteht Gefahr, daß Kohle nicht nur das freie Antigen, sondern auch Antigen-Antikörper-Komplexe aus dem Inkubationsmedium entfernt. Die radioimmunologischen Messungen können dadurch verfälscht werden. Die hohe Verdünnung der verwendeten Antikörper ( ca.  $1 : 10^4$  ) läßt dies auch hier möglich erscheinen. Durch den Zusatz von inertem Gammaglobulin zum Puffer, in dem die Antikörper gelöst werden, ist die mögliche Fehlerquelle beseitigt.
2. Dextran-Kohle-Suspension stört das Gleichgewicht zwischen Antigen und Antikörper, das sich während der Inkubationsperiode einstellt, indem sie das freie Antigen aus dem Ansatz entfernt, und begünstigt dadurch die Dissoziation der Immunkomplexe ( 269 ) . Dieser Effekt ist umso stärker, je länger inkubiert wird. Möglichst kurze, vor allem aber konstante Inkubationszeiten von Ansatz und Adsorbens sind daher unabdingbare Voraussetzung für die gute Reproduzierbarkeit der Trennung von freiem und gebundenem Antigen. Durch die exakte Einhaltung einer jeweils 15minütigen Inkubationsdauer im hier geschilderten Meßverfahren ist diese Voraussetzung erfüllt .

### Die Spezifität der Antikörper

Aus einer systematischen Untersuchung von NISWENDER ( 265 ) über die Spezifitätsmerkmale von Progesteron-Antikörpern ist zu entnehmen, daß Antikörper, die gegen Progesteron-C 3-Konjugate ge-

bildet werden - in diese Gruppe gehört der hier verwendete Antikörper - , nur relativ progesteron-spezifisch sind, während der höchste Spezifitätsgrad Antikörpern zukommt, die gegen ein C 6 - oder ein C 11 - Konjugat produziert werden ( 27 ). Berücksichtigt man den Umstand, daß durch die Konjugation des Progesteronmoleküls mit dem Carriermolekül an C 3 eine der drei molekültypischen Gruppen des Hormons, nämlich die 3 - oxo - Gruppe " maskiert " ist, so weist der im hier beschriebenen Progesteron-RIA verwendete Antikörper sehr geringe Kreuzreaktionen mit chemisch nahe verwandten Steroiden auf. Die Kreuzreaktion mit DOC darf allerdings nicht unbeachtet bleiben; auf die Spezifität der Progesteronbestimmungen ist sie jedoch ohne Einfluß, da Progesteron chromatographisch exakt von DOC abgetrennt werden kann. Umgekehrt werden Zweifel an der Spezifität des Progesteron-RIA, die sich auf die gleichzeitige Elution von Progesteron und Androstendion in der 2.Chromatographie beziehen, durch die verschwindend geringe Kreuzreaktion des Progesteron-Antikörpers mit dem Androgen ausgeräumt.

Wie eminent wichtig die chromatographische Isolierung und Reinigung von Steroidhormonen ist, wenn nur relativ spezifische Antikörper für die radioimmunologische Bestimmung verfügbar sind , belegt das Beispiel des DOC. In Anbetracht der hohen Kreuzreaktion des DOC-Antikörpers v.a. mit Progesteron, aber auch mit 17-OH-Progesteron und den Androgenen sind allein die chromatographischen Schritte ausreichende Garantie für die Spezifität der DOC-Bestimmungen. Ihre Erklärung findet die hohe Kreuzreaktivität des DOC-Antikörpers in der Tatsache, daß durch die Placierung der Konjugationsstelle des Steroidmoleküls mit dem Carrierprotein an C 21 des Sterangerüsts die wichtigste " Erkennungsgruppe " des DOC-Moleküls, die Hydroxymethylgruppe an C 21 " maskiert " ist.

Als Immunogene zur Produktion von 17-OH-Progesteron-Antikörpern werden von BAUMINGER et al. ( 27 ) C 7 - Proteinkonjugate des Steroids empfohlen. Der Autor erklärt die Spezifität der dagegen gebildeten Antikörper damit, daß durch die Konjugation in der Position C 7 sämtliche molekültypischen Gruppen des 17-OH-Progesterons unverändert erhalten bleiben. Bei dem 17-OH-Progesteron-C 3 - Konjugat, das zur Gewinnung des hier verwendeten Antikörpers

verwendet wird, ist zwar die funktionelle Oxo-Gruppe an C 3 "maskiert" worden, die das Molekül typisierende 17-Hydroxyl-Gruppe jedoch unangetastet geblieben. Die allgemein niedrige Kreuzreaktivität des 17-OH-Progesteron-Antikörpers 140 mit den wichtigsten Corticosteroiden und gonadalen Steroiden ist deshalb nicht überraschend. Die Affinität des AK 140 zu Progesteron ist ohne Einfluß auf die Spezifität der 17-OH-Progesteronbestimmungen, nachdem beide Steroide chromatographisch exakt voneinander getrennt werden können.

### Das Blankproblem

RIA-Blanks sollten nicht mehr als 10 % der maximalen in den Eichproben eingesetzten Substanzmenge betragen. Diese Forderung von ABRAHAM et al. ( 6 ) ist bei dem dargestellten kombinierten chromatographisch - radioimmunologischen Verfahren erfüllt. In erster Linie der bei Verwendung von Sephadex-Gelen bekannt niedrige Chromatographie-Blank ( 254 ), in zweiter Linie die zur Elimination positiver Blanks ergriffenen technischen Maßnahmen ( Ausglühen der Glasware, Zusatz von steroidfreiem Säuleneluat zu den Standardproben, Einhaltung konstanter Zeit- und Temperaturverhältnisse beim RIA ) tragen dazu bei.

Oft unbeachtet bleibt in der Diskussion über Blanks die Tatsache, daß die - häufigeren - positiven Blanks durch gleichzeitig vorhandene negative Blanks ausgeglichen bzw. gesenkt werden können. Das Blankproblem ist damit nur scheinbar befriedigend gelöst, da die ursächlich wirkenden Faktoren weiterbestehen. Eine der zahlreichen möglichen Ursachen negativer Blanks ist bei dem hier besprochenen Meßverfahren faßbar und sogar recht genau zu taxieren: Die Kontamination der gereinigten Testprobe durch Reste von Tracermaterial, das zur Berechnung der Wiederfindung bei den Reinigungsschritten in den Probenansatz eingebracht wird. Von den ursprünglich 1000 - 1200 cpm markierter Substanz im Ansatz des Testmaterials gelangen nach den Reinigungs- und Teilungsschritten noch ca. 180 - 220 cpm in das einzelne RIA-Röhrchen. Das sind 3 - 3.5 % der RIA-Tracermenge ( ca. 6000 cpm ). ABRAHAM et al. ( 2 ) halten einen "Tracer-Übertrag" von bis zu 3 % der Leerwert-Aktivität, YOSHIMI et al. ( 422 ) und STROTT ( 376 ) sogar einen von bis zu 5 % indes für vernachlässigbar klein.

Auf eine Subtraktion der Blanks von den RIA-Rohmeßwerten der Testproben wird verzichtet. Hauptgrund dafür ist das niedrige Blankniveau, das meist unter der Sensitivitätsschwelle des RIA liegt; ABRAHAM ( 6 ) empfiehlt die Subtraktion nur für den Fall, daß die Blankwerte die untere Sensitivitätsgrenze überschreiten. Grundsätzlich erscheint eine arithmetische Behandlung von Blankwerten, d.h. die Subtraktion von den Meßergebnissen, aber schon deshalb unangebracht, weil die Blankwerte von Probe zu Probe und mit den Wiederfindungen variieren und außerdem nicht im gesamten Bereich der Standardkurve reproduzierbar sind ( 266, 287 ) .

#### 4.1.4. DISKUSSION DER ARBEITSWEISE BEI DER ENZYMATISCHEN CHOLESTERINBESTIMMUNG

Die enzymatische Bestimmung von Cholesterin im Plasma der Versuchstiere zeichnet sich durch ihre Praktikabilität und Zuverlässigkeit aus. In Anbetracht der geringen Plasmamengen, die zur Cholesterinbestimmung zur Verfügung stehen, erweist es sich als besonders vorteilhaft, daß die Fraktionen des Plasmacholesterins aus der gleichen kleinen Plasmamenge von 0,050 ml bestimmt werden können. Die Pipettiergenauigkeit ist durch die Verwendung verdünnter Proben, aus denen 0,100 ml - Aliquots - im Gegensatz zu 0,020 ml - Aliquots bei Einsatz unverdünnter Proben - eingesetzt werden, gesteigert. Die allgemeinen Praktikabilitätsmerkmale und die Spezifität der enzymatischen Methode der Cholesterinbestimmung sind in 1.2.3.4.2. dargestellt.

Der Mittelwert der Analysen (  $n=16$  ) der Precimat<sup>R</sup>-Standard-Cholesterinlösung weicht vom Sollwert nur geringfügig ( 2.5 % ) ab. Die Bestimmung des Gesamtcholesterins im Humanplasma läßt sich innerhalb derselben Analyse mit einem VK < 2.5 % und bei wiederholten Messungen mit einem VK < 5 % reproduzieren. Diese Ergebnisse der regelmäßig durchgeführten Kontrollmessungen befriedigen die Ansprüche an die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode .

## 4.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER MESSUNGEN

AM UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Der Entblutungsschock ist für jeden Organismus ein pathologischer Zustand. Ob die davon betroffenen Individuen auf den Stress der massiven Hämorrhagie physiologisch " richtig " oder patho-physiologisch reagieren, ist einmal davon abhängig, ob ihre Organe in dieser Situation funktionsfähig bleiben oder sogar zu gesteigerter Leistung imstande sind. Für die NNR sind sowohl Funktionserhaltung als auch Leistungssteigerung als schocktypische Reaktionsformen wohl dokumentiert. Neben Herz und Gehirn ist die Nebenniere im zentralisierten Kreiskauf das bestperfundierte Körperorgan, die Sekretion der hochwirksamen Hormone Aldosteron und Cortisol ist während des hämorrhagischen Schocks deutlich gesteigert ( 234 ) .

Andererseits ist zu berücksichtigen, ob die Individuen so ausgereift sind, daß ihre Anti-Stress-Aktionen ökonomisch und koordiniert ablaufen können. Der Frage nach der Abhängigkeit der NNR-Schockreaktion vom Alter der dem Schockstress unterworfenen Individuen kommt damit entscheidende Bedeutung zu. Die hier vorgelegten Meßergebnisse sind aus Schockversuchen an Hundewelpen gewonnen. Sie können daher zur Aufklärung von Besonderheiten der NNR-Schockreaktionen im jungen Lebensalter beitragen .

Die Beurteilung therapeutischer Maßnahmen richtet sich vorwiegend danach, inwieweit durch die Behandlung pathologische Zustände verhindert oder beseitigt werden und welcher Heilerfolg daraus resultiert. Doch darüberhinaus ist es von Interesse zu erfahren, wie die physiologischen Reaktionen des Organismus auf das pathologische Geschehen durch die eingeleitete Therapie beeinflußt werden. Bei der Schocktherapie mit Mineralocorticoiden verdienen die Rückwirkungen auf die endogene Bildung der Corticosteroide besondere Beachtung. Die quantitative Erfassung einer Reihe von Vor- und Zwischenstufen der Steroidogenese im peripheren Plasma bietet einen Ansatzpunkt zur Klärung der Interaktionen exogener Mineralocorticoide mit der Biosynthese der NNR-Hormone .

## 4.2.1. DIE SITUATION VOR DEM HÄMORRHAGISCHEN SCHOCK

Sowohl Cholesterin und seine Fraktionen als auch die NNR-Steroide Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron besitzen im Kontrollplasma der Welpen, also vor Einleitung des hämorrhagischen Schocks - bei aller Variabilität der Einzelwerte - relativ hohe Spiegel. Für das jugendliche Alter der Hunde besonders überraschend ist die hohe Konzentration des Gesamtcholesterins, die mit umgerechnet 335 mg / 100 ml weit in dem für den Menschen als pathologisch angesehenen Bereich liegt. Die Tatsache, daß die Konzentration des freien Cholesterins vor der Entblutung um so höher ist, je jünger die Tiere sind, kann vielleicht damit erklärt werden, daß die Cholesterin-Veresterungsaktivität des Plasmas bei den Welpen noch nicht voll entwickelt ist. Von den hier untersuchten Steroiden wird lediglich das 11-Desoxycorticosteron mit Sicherheit allein in der Nebennierenrinde produziert (vgl. Abb. 2). Die basalen Konzentrationen von Progesteron und 17-OH-Progesteron sind aber mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls adrenalen Ursprungs, da in Anbetracht des geringen Alters der Versuchstiere eine Ausschüttung der beiden Steroide aus den Gonaden, zumal in der Stresssituation vor Einleitung des Entblutungsschocks, kaum zu erwarten ist.

## 4.2.2. DAS ADRENALE GESCHEHEN IN DER OLIGÄMISCHEN SCHOCKPHASE

Die markanteste Veränderung der Meßwerte sowohl zu Beginn als auch im Verlauf der oligämischen Schockphase zeigen das Plasmacholesterin und seine Fraktionen. An der hochsignifikanten Senkung ihrer Plasmaspiegel fallen sowohl das Ausmaß der Veränderung als auch die Geschwindigkeit, mit der sie sich vollzieht, auf.

Unter physiologischen Bedingungen werden nur wenige Prozent des Gesamtcholesterins zur Steroidsynthese in endokrinen Organen verwendet. Die Hauptmenge des in Vertebraten synthetisierten Cholesterins wird in der Leber metabolisiert und in Form von Gallensäuren und nicht abgebauten Sterinen mit den Faeces ausgeschieden. Dabei wird das große Substratreservoir des Plasmacholesterins im allgemeinen erst im verlängerten Stress angegriffen, wenn das in den Nebennieren gespeicherte Cholesterin als sofort verfügbare Substratquelle der Corticosteroidogenese erschöpft ist.

Um eine Erklärung für die Meßergebnisse geben zu können, muß man davon ausgehen, daß die durch die Entblutung verursachte Hypovolämie ( maximal entblutetes Volumen:  $40 \pm 10$  ml / kg KG ) und der konstant gesenkte Blutdruck ( 40 mm Hg ) der Hundewelpen einen starken Reiz auf die Aktivität der hypothalamo-hypophyso-adrenalen Achse ausüben ( 119, 120, 293 ). Zwischen dem Schockereignis und dem Einsetzen gesteigerter ACTH-Sekretion aus dem HVL liegt eine sehr kurze Latenzzeit. Nach NELSON et al. ( 260 ) beträgt sie lediglich 15 Sekunden. Wie lange es danach dauert, bis die NNR-Steroidogenese beschleunigt abläuft und vermehrt Hormone ausgeschüttet werden, ist strittig. Die Zeitangaben in der Literatur liegen zwischen wenigen Minuten ( 227, 280 ) und einer halben Stunde ( 25, 395 ). Elektronenmikroskopisch lassen sich erstmals fünf Minuten nach einem Stress-Stimulus morphologische Veränderungen in den NNR-Zellen feststellen ( 300 ); in den Untersuchungen von FRAHM ( 110 ) ist 80 Minuten nach einer ACTH-Injektion eine Volumenzunahme der Mitochondrien in den Fasciculata-Zellen als Ausdruck erhöhter Syntheseaktivität erkennbar .

Das außerordentlich rasche Absinken des Plasma-Cholesterinspiegels bei den Welpen während der Entblutung und im Verlauf der oligämischen Schockphase läßt sich nur aus dem Zusammenwirken mehrerer ursächlicher Faktoren erklären. Vorauszusetzen ist, daß trotz des stark verringerten zirkulierenden Blutvolumens die NNR-Perfusion erhalten, ja sogar gesteigert ist ( 358 ). ACTH selbst vermag die Durchblutung des Organs zu erhöhen ( 29 ). Zur gleichen Zeit muß die Membranbarriere, die unter physiologischen Bedingungen die Rate des aus dem Plasma in die NNR aufgenommenen Cholesterins entscheidend limitiert, fallen oder zumindest sehr durchlässig werden. Ein Unterschied in der Membranpermeabilität für freies und verestertes Cholesterin besteht dabei offenbar nicht, da die Plasmaspiegel beider Cholesterinfraktionen etwa gleich schnell absinken. Wodurch die Permeabilitätssteigerung der Membranen in den NNR-Zellen hervorgerufen wird, muß dahingestellt bleiben. Eine direkte Membranwirkung des ACTH ist nicht auszuschließen. Calciumionen wird über ihre allgemeine Bedeutung für die Funktionsfähigkeit der NNR ( 140, 281, 282, 283 ) und die hormongesteuerten Ereignisse ( 290 ) hinaus eine Beteiligung an der Permeabilitätssteigerung der Mitochondrienmembranen in den

NNR-Zellen für Plasmacholesterin zugesprochen ( 186 ); eine deutliche Erhöhung des Serum-Calcium, die als Indiz für eine derartige Wirkung der Ionen gedeutet und mit dem gesenkten Plasmacholesterin in Verbindung gebracht werden könnte, tritt jedoch bei den Schockversuchen mit den Hundewelpen nicht ein. Allerdings haben auch FLYNN et al. ( 109 ) bei Schockversuchen an narkotisierten Hunden nur eine geringe Korrelation zwischen ACTH und  $\text{Ca}^{++}$  im Serum finden können. Fehlen auch eindeutige Beweise dafür, daß die Aufnahmefähigkeit der NNR für Plasmacholesterin im Schock erhöht ist, so läßt doch allein die Tatsache der rapiden Senkung des Plasmacholesterins während des gesamten Schockverlaufs nur die Schlußfolgerung zu, daß das aus dem Plasma entfernte Cholesterin in der auf die Stressituation des hämorrhagischen Schocks überschießend reagierenden Nebennierenrinde verbraucht wird .

Damit, daß die Nebennieren der Hundesäuglinge wenig oder kein Cholesterin gespeichert haben, läßt sich das Ausmaß der Cholesterinaufnahme aus dem Plasma in die NNR ebenfalls erklären. Immerhin beträgt die Konzentration des Plasma-Gesamtcholesterins am Ende der Versuche im Mittel nur 50 % der zur Kontrollzeit gemessenen Spiegel. Die ausgeprägte Senkung des Plasmacholesterins mag man teilweise als eine für das jugendliche Alter der Tiere typische nicht streng kontrollierte Reaktion deuten. Doch auch beim erwachsenen Menschen, der einen relativ konstanten Cholesterinspiegel besitzt, sind ein bis zwei Tage nach der Stressituation eines chirurgischen Eingriffs um 60 % gegenüber dem präoperativen Wert erniedrigte Plasmacholesterinspiegel gemessen worden ( 385 ). Ob bei den Hundewelpen während des hämorrhagischen Schocks die adrenale Cholesterinsynthese gesteigert ist, um dem Substratbedarf der Steroidsynthese nachzukommen, läßt sich nach den vorliegenden Meßwerten nicht entscheiden. Möglicherweise wäre die Senkung des Plasmacholesterins ohne gleichzeitige Beschleunigung der Cholesterinsynthese in der NNR während des Schocks noch stärker ausgeprägt. Auch über den Anteil von in der Leber neusynthetisiertem und / oder aus der Leber mobilisiertem Cholesterin am Plasmacholesterin sind nur Vermutungen möglich. Zumindest während der hypovolämischen Schockphase ist beim Gesamtcholesterin keine Stabilisierungstendenz zu erkennen, die auf eine Abgabe von Cholesterin aus der Leber ( und anderen zur Cholesterinbildung befähigten Organen, z.B. Darm ) ins Blut schließen ließe. Der fehlende bzw.

geringe Cholesterinnachschub aus diesen Organen kann mit ihrer unzureichenden Perfusion in der oligämischen Schockphase erklärt werden. Umgekehrt ist es wahrscheinlich, daß die Verlangsamung der Senkung des Plasmacholesterins nach Reinfusion wenigstens teilweise aus der vermehrten Bereitstellung von Cholesterin aus den dann wieder besser durchbluteten Organen beruht .

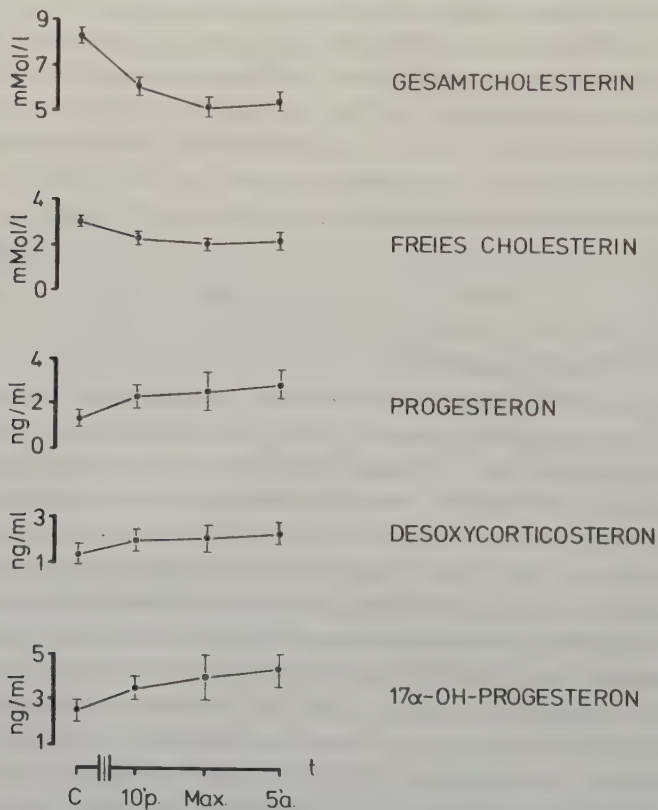


Abb.49 : Synopsis der Meßwerte ( MW  $\pm$  SEM ; n = 29 ) für Gesamtcholesterin, Freies Cholesterin, Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron im peripheren Plasma der Hundewelpen zur Kontrollzeit ( C ) und während der oligämischen Phase des hämorrhagischen Schocks ( 10'p, Max., 5'a )

Wie Abb.49 verdeutlicht, verlaufen die Erniedrigung des Cholesterinspiegels und die Erhöhung der Konzentration von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron im peripheren Plasma der Welpen während der oligämischen Schockphase zeitlich nahezu parallel. Die Reaktion Cholesterin - Pregnenolon, der Biosyntheseschritt, der Geschwindigkeit und Umsatzrate der Hormonsynthese limitiert, wird unter dem ACTH-Einfluß offenbar rasch vollzogen. Die NNR-Steroidogenese kann also auch bei jungen Hunden im Alter von zwei bis vier Wochen binnen weniger Minuten angekurbelt werden. Über ähnliche Reaktionsformen bei jungen Ratten berichten eine Reihe von Untersuchern ( 56, 81, 143, 216, 425 ). Nach ihren übereinstimmenden Befunden sind Ratten vom 11.Lebenstag an fähig, auf eine Stressituation mit gesteigerter Hormonausschüttung zu reagieren. Nach 21 Tagen sind ihre neurosekretorischen Mechanismen voll entwickelt, so daß die NNR-Sekretion dann maximal stimuliert werden kann.

Der Cholesterinaufnahme in die NNR folgt als Ausdruck der forcierten Hormonsynthese die gesteigerte Produktion der biologisch inaktiven oder zumindest in Stressituationen wenig aktiven Prähormone, zu denen Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron gehören. Wahrscheinlich wegen der hohen Umsatzrate ( 167 ) bleiben ihre NNR-Konzentrationen jedoch unverändert ( 227 ). Die Frage, ob physiologisch wenig aktive Zwischenprodukte der Steroidsynthese in Stressituationen aus der NNR sezerniert werden oder nicht, wird in der Literatur unterschiedlich beantwortet. LOMMER et al. ( 227 ) und BROWN et al. ( 50 ) folgern aus ihren Untersuchungen, daß Pregnenolon und Progesteron bzw. DOC wegen ihrer fehlenden oder geringen Anti-Stress-Aktivität nicht aus der NNR sezerniert werden. Dagegen stellen BERMUDEZ et al. ( 31 ) bei ACTH-Experimenten eine deutliche Erhöhung der Konzentration von Intermediärsubstanzen der Steroidogenese im peripheren Plasma fest und schließen daraus, daß diese Veränderungen geradezu beweisend seien für eine forcierte Steroidsynthese in der NNR. Die hier vorliegenden Ergebnisse der Messungen von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron im peripheren Plasma lassen sich weder mit der einen noch der anderen Hypothese allein befriedigend erklären. Einerseits legen die im Durchschnitt gegenüber den Kontrollwerten verdoppelten Plasmaspiegel von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron am Ende der

hypovolämischen Schockphase sowie die signifikante positive Korrelation zwischen den DOC - und 17-OH-Progesteron - Meßwerten 5 min vor Reinfusion und den individuellen Überlebenszeiten den Schluß nahe, daß die Hormonvorstufen tatsächlich sezerniert werden, und zwar um so mehr, je größer die lebensverlängernde Aktivität der NNR ist. Zum anderen läßt sich in Anbetracht der niedrigen Plasmaspiegel der gemessenen Steroide auch eine Verdopplung ihrer Plasmakonzentrationen mit der massiven Senkung des Plasmacholesterins und Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Aldosteron und Cortisol in Stressituationen nicht vergleichen. Insgesamt sprechen mehr Anzeichen dafür, daß Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron während des Schocks in der NNR rasch gebildet und ebenso rasch weiterverstoffwechselt werden, ohne daß es zu einer nennenswerten Sekretion kommt. Daß sich dennoch ihre Plasmakonzentrationen etwas erhöhen, läßt sich möglicherweise darauf zurückführen, daß im Überschuß gebildete Prähormone, für die die Metabolisierungskapazität der NNR nicht ausreicht, durch einen "Überlaufmechanismus" aus dem Organ entfernt und ins Blut abgegeben werden.

#### 4.2.3. DAS ADRENALE GESCHEHEN IN DER NORMOVOLÄMISCHEN SCHOCKPHASE UNTER KONTROLLBEDINGUNGEN

Die Dynamik der Veränderungen in den Plasmakonzentrationen des Cholesterins und der adrenalen Prähormone bei den Welpen während des Schocks ist nicht allein auf die Aufnahmekapazität bzw. Sekretionsleistung der NNR zurückzuführen. Nicht unerheblich wird die aktuelle Plasmakonzentration der Meßgrößen zu den verschiedenen Zeiten auch durch die Flüssigkeitsverschiebungen und die daraus resultierenden Volumenänderungen in den Flüssigkeitsräumen der Tiere beeinflusst. Die für die oligämische Schockphase ermittelten Plasmakonzentrationen beziehen sich auf die Summe von zirkulierendem Blut ( bzw. Plasma ) volumen der Tiere und dem Volumen des interstitiellen und intrazellulären ( 157 ) Wassers, das durch den transkapillären Flüssigkeitseinstrom ( Autotransfusion ) in den Kreislauf der Tiere gelangt. Die Meßwerte aus der normovolämischen Schockperiode geben dagegen die Konzentrationen der Meßgrößen im Gesamt - Blut ( bzw. Plasma ) volumen wieder. Die Differenzen zwischen den Meßwerten 5 min vor und 15 min nach Re-

infusion beruhen daher überwiegend auf der Volumenänderung des zirkulierenden Blutes, die durch die Reinfusion des extrakorporalen Blutvolumens entsteht. Im extrakorporalen Blut bleiben die Konzentrationen von Cholesterin und der adrenalen Prähormone auf dem Niveau der Kontrollmeßwerte, die im Gesamtvolumen ermittelt werden. Bei der Rückblutung gelangt also relativ cholesterinreiches bzw. an Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron armes Blut in den Kreislauf. Daraus resultieren der deutlich erhöhte Cholesterinspiegel und die gesenkten Konzentrationen von Progesteron und 17-OH-Progesteron, die kurz nach der Rückblutung bei den Welpen gemessen werden. An den DOC-Spiegeln läßt sich die gleiche Beobachtung nur bei den unbehandelten Tieren machen, hingegen nicht in den Therapiegruppen. Hierin manifestiert sich deutlich ein Einfluß der Aldosterontherapie auf die Steroidogenese (s.u.).

Die Sonderstellung des DOC unter den Intermediärprodukten der Steroidogenese läßt sich innerhalb der Kontrollgruppe weiterverfolgen: Nur der Plasmaspiegel des DOC, nicht aber die von Progesteron und 17-OH-Progesteron, sind bei jenen drei Tieren, die das Ende des Versuchs nicht erleben, vom Ende der oligämischen Schockphase an nicht mehr meßbar. Es wäre jedoch unstatthaft, diese Beobachtung am DOC auf ein ( partielles ) Versagen der NNR zurückzuführen und damit den frühen Tod der Tiere erklären zu wollen. Es deuten im Gegenteil die Meßwerte der normovolämischen Schockphase - Senkung des freien und veresterten Cholesterins, Erhöhung des Quotienten: Freies / Verestertes Cholesterin und des mittleren Plasmaspiegels von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron - darauf hin, daß die NNR, nach der Zäsur der Reinfusion des extrakorporalen Volumens, weiterhin maximal stimuliert ist und Hormone produziert. Die Funktionsfähigkeit der NNR bei den Hundesäuglingen nimmt also offenbar auch im verlängerten Schock keinen merklichen Schaden. Es besteht kein Anhalt für die Annahme, daß ein Zustand " adrener Erschöpfung " ( 92 ) eintritt. Die Nebennieren werden auch bei dem in der hypovolämischen Schockphase auf konstant 40 mm Hg gesenkten Blutdruck noch so gut perfundiert, daß eine gesteigerte Steroidproduktion und -sekretion möglich ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden von HUME et al. ( 173 ) und FRANK et al. ( 112 ), wonach erst unterhalb eines Blutdrucks von 35 bzw. 30 mm Hg eine gesteigerte

Hormonsekretion aus der NNR nicht mehr möglich ist. Der minimale adrenale Blutfluß, bei dem die Leistungsfähigkeit der NNR auch nach langen Entblutungszeiten erhalten bleibt, wird von HERMAN et al. ( 155 ) mit 1 ml / min angegeben. Ist das Perfusionsvolumen in der Zeiteinheit unter diese Marke gesenkt, dann tritt allerdings ein irreversibler Ischämieschaden der NNR ein .

#### 4.2.4. DAS ADRENALE GESCHEHEN IN DER NORMOVOLÄMISCHEN SCHOCKPHASE UNTER DER THERAPIE MIT ALDOSTERON

Die auffälligsten Unterschiede zwischen den Messungen bei den unbehandelten und den mit Aldosteron therapierten Tieren zeigt das Plasma-DOC. Bei den übrigen Meßgrößen fehlen Unterschiede zwischen den in den verschiedenen Gruppen ermittelten Werten entweder ganz ( bei Cholesterin und Progesteron ) oder sie sind so diskret - der Plasmaspiegel von 17-OH-Progesteron ist nur in der Therapiegruppe 2 zeitweise signifikant gegenüber dem Kontrollwert erhöht - , daß daraus keine Rückschlüsse gezogen werden können. Im Verhalten des Plasma-DOC widerspiegelt sich dagegen offensichtlich ein Einfluß der Aldosterontherapie auf die Steroidogenese in der NNR. Dieser Effekt des exogenen Aldosterons wird im Gegensatz zu den Wirkungen des Mineralocorticoids auf den Elektrolyt- und Säure-Basen-Status, die sich bei den Hundewelpen mit einer Latenzzeit von etwa 45 min einstellen, rasch registrierbar.

Bereits 15 min nach Beendigung der Reinfusion ist die mittlere Plasma-DOC-Konzentration in beiden Therapiegruppen signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Zwischen der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe 2 existiert diese Differenz zwar bereits in der Oligämiephase, so daß ihr Fortbestand in der normovolämischen Schockphase möglicherweise nicht auf die Aldosterontherapie zurückzuführen ist. Im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Therapiegruppe 1 ist der Meßpunkt 15 min nach Reinfusion jedoch der erste Zeitpunkt, an dem der Unterschied der DOC-Mittelwerte signifikant ist. Knapp 30 min vorher wird den therapierten Versuchstieren erstmals Aldosteron injiziert. In dieser kurzen Zeitspanne vermag die Nebenniere offensichtlich 1) den durch die Therapie mit Aldosteron enorm erhöhten Aldosteronspiegel des Plasmas - direkt oder indirekt - zu registrieren und 2) die Biosynthese des Aldosterons an der Zwischenstufe des DOC abzubrechen oder zu

drosseln und die Intermediärsubstanz DOC vermehrt ans Plasma abzugeben. Der Beitrag des so erhöhten Plasma-DOC zur beschleunigten Rückkehr der therapierten Tiere zur Normokaliämie und Normhydrie in der normovolämischen Schockphase ist freilich vernachlässigbar klein. Für die anti-hyperkaliämischen und anti-acidotischen Therapieeffekte ist allein das hochwirksame Aldosteron verantwortlich. Eine signifikante Differenz zwischen den mittleren Plasma-DOC-Spiegeln von Kontrollgruppe und Therapiegruppe 1 ist noch einmal 3 h nach Reinfusion zu beobachten; die signifikante Differenz zwischen den mittleren Plasma-DOC-Spiegeln von Kontrollgruppe und Therapiegruppe 2 kehrt 1 h, 2 h und 4 h nach Reinfusion wieder. Dieser Unterschied zwischen den DOC-Spiegeln der beiden Therapiegruppen im Verhältnis zur Kontrollgruppe ist wahrscheinlich auf eine Dosisabhängigkeit der Hemmung der endogenen Aldosteronbiosynthese durch exogenes Hormon zurückzuführen: Je mehr der Aldosteronplasmaspiegel erhöht ist und je stärker deshalb die Biosynthese des Aldosterons eingeschränkt wird, um so länger wird DOC verstärkt aus den Nebennieren ins Blut sezerniert.

Der Rückkopplungseffekt des hohen Plasma-Aldosterons auf die Steroidogenese, der zur gesteigerten DOC-Ausschüttung führt, ist vergleichbar mit einer - von BAILEY et al. ( 20 ) allerdings lediglich zur Diskussion gestellten - Folgewirkung des Einflusses von Heparin auf die NNR-Steroidogenese: Die Autoren äußern nämlich die Vermutung, daß die NNR auf die durch Heparin gesenkte Aldosteronproduktion ( 193 ) mit vermehrter Sekretion anderer Steroide mit mineralocorticoider Aktivität, z.B. DOC, reagiert. Eine nach diesem Mechanismus durch Heparin gesteigerte DOC-Sekretion ließe sich jedoch erst nach langer Latenzzeit feststellen, da unter einer Heparin-Medikation die Aldosteron-Sekretionsrate erst nach 4 - 5 Tagen auf weniger als die Hälfte des Ausgangswerts zurückgeht ( 60, 237 ). Die den Hundesäuglingen zur Prophylaxe der disseminierten intravasalen Gerinnung bei Versuchsbeginn applizierte Heparindosis ist daher sicher ohne Wirkung auf die NNR-Steroidogenese während des Schocks. Doch selbst unter der Hypothese, daß Heparin rasch in der Nebenniere wirksam werden kann, lassen sich die erhöhten Plasma-DOC-Konzentrationen nicht als Effekt der Antikoagulations-therapie deuten. Da sämtliche Tiere Heparin erhalten, müßten die DOC-Spiegel in allen drei Gruppen erhöht sein. Die Veränderungen des DOC-Spiegels werden jedoch nur in den Therapiegruppen beobachtet.

## 5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Arbeit gliedert sich in einen M e t h o d i k t e i l und einen E r g e b n i s t e i l :

Im M e t h o d i k t e i l wird ein kombiniertes chromatographisch - radioimmunologisches Meßverfahren zur Bestimmung der Konzentrationen von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron in kleinen Plasmaproben beschrieben. Die Isolierung und Reinigung der Substanzen gelingt in zwei aufeinanderfolgenden Flüssigkeits - säulenchromatographien ( Gel : Sephadex LH 20 ; Laufmittel : Dichlormethan : Methanol 98 : 2 bzw. Heptan : Chloroform : Äthanol : Wasser 50 : 50 : 0.25 : 0.02 ). Die mittleren Wiederfindungsraten betragen 50 bis 70 Prozent. Die radioimmunologische Bestimmung wird in Gleichgewichtstechnik unter Verwendung weitgehend spezifischer Antikörper und einer Dextran - Kohle - Suspension zur Trennung des freien und gebundenen Antigens durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze der Methode beträgt für Progesteron 0.07 ng / ml, für DOC 0.10 ng / ml und für 17-OH-Progesteron 0.09 ng / ml. Die Meßergebnisse sind gut reproduzierbar : Inter-Assay-Variationskoeffizient für Progesteron : 14.35 % , für DOC : 14.43 % und für 17-OH-Progesteron : 12.34 % . Aus diesen und weiteren Daten geht hervor, daß das Meßverfahren für die zuverlässige Bestimmung niedriger Plasmakonzentrationen von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron geeignet ist .

Der E r g e b n i s t e i l enthält die nach der beschriebenen Methode bestimmten Plasmakonzentrationen von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron sowie die enzymatisch gemessenen Plasmakonzentrationen von Cholesterin und seiner beiden Fraktionen bei Hundewelpen im unbehandelten und im mit hohen Aldosterondosen therapierten standardisierten hämorrhagischen Schock. Sämtliche Schockwerte des Plasmacholesterins sind gegenüber dem Kontrollwert signifikant erniedrigt. Die Plasmaspiegel von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron sind im Schock gegenüber den Ausgangs-

werten geringgradig erhöht. Die mit Aldosteron behandelten Welpen besitzen nach der Reinfusion des extrakorporalen Blutvolumens signifikant höhere Plasma-DOC-Konzentrationen als die unbehandelten Versuchstiere. Die Meßdaten legen nahe, daß die Welpen im Schock erhöhten Substratbedarf der NNR - Steroidogenese vorwiegend aus dem Plasmacholesterin decken. Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron werden als biologisch nur wenig aktive Intermediärsubstanzen der Steroidogenese kaum von der NNR sezerniert, sondern zu den hochwirksamen Hormonen umgesetzt. Die nach Aldosteronapplikation erhöhten Plasma-DOC-Konzentrationen der Hundewelpen werden damit erklärt, daß durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die endogene Aldosteronproduktion und -sekretion eingeschränkt wird und dafür DOC als biosynthetische Vorstufe des Aldosterons vermehrt ins Plasma abgegeben wird.

## 6. A N H A N G

## 6.1. VERZEICHNIS DER BENÜTZTEN LITERATUR

- ( 1 ) ABRAHAM G.E. J Clin Endocrinol 29(1969)866
- ( 2 ) ABRAHAM G.E.,SWERDLOFF R.,TULCHINSKY D.,ODELL W.D.  
J Clin Endocrinol Metab 32(1971)619
- ( 3 ) ABRAHAM G.E.,SWERDLOFF R.,TULCHINSKY D.,HOPPER K.,ODELL  
W.D. J Clin Endocrinol Metab 33(1971)42
- ( 4 ) ABRAHAM G.E.,ODELL W.D.,SWERDLOFF R.,HOPPER K. J Clin  
Endocrinol Metab 34(1972)312
- ( 5 ) ABRAHAM G.E.,LABUDOVICH M.,ODELL W.D.,MISHELL D.R.,NAKA-  
MURA R.M. Analyt Letters 5(1972)105
- ( 6 ) ABRAHAM G.E. Clin Biochem 7(1974)193
- ( 7 ) ABRAHAM G.E. Acta Endocr(Kbh)75 Suppl.(1974)183
- ( 8 ) ADAMS E.,BAXTER M. Arch Path Chicago 48(1949)13
- ( 9 ) ÄNGGARD E.,BERGKVIST H. J Chromatogr 48(1970)542
- ( 10 ) AGARWAL M.K.,HOFFMANN W.W.,ROSEN F. Biochim Biophys Acta  
177(1969)250
- ( 11 ) AGASHE B.D.,WEAVER R.G.,EIK-NES K.B. Proc Soc Exp Biol Med  
107(1961)398
- ( 12 ) ALLAIN C.G.,POON L.S.,CHAN C.S.G.,RICHMOND W.,FU P.C.  
Clin Chem 20(1974)470
- ( 13 ) ALLISON A. Advances Chemother 3(1968)253
- ( 14 ) ANDERSON B.G.,BEIERWALTES W.H. Adv Intern Med 19(1974)327
- ( 15 ) ANDERSON R.A.,BROOKS C.J.W.,KNIGHTS B.A.  
J Chromatogr 75(1973)247
- ( 16 ) ANONYMUS Documenta Geigy(Basel, 1968)177
- ( 17 ) ARMSTRONG J.G. Proc Soc Exp Biol Med 102(1959)452
- ( 18 ) ARNOLD M.L.,JAMES V.H.T. Steroids 18(1971)789
- ( 19 ) AVIVI P.,SIMPSON S.A.,TAIT J.F.,WHITEHEAD J.K.  
Radioisotope conf.Oxford 1(1954)313
- ( 20 ) BAILEY R.E.,FORD H.C. Acta Endocr(Kbh)60(1969)249
- ( 21 ) BALDWIN D.M. Biol Reprod 10(1974)495
- ( 22 ) BALL E.G.,JUNGAS R.L. Rec Progr Horm Res 20(1964)183
- ( 23 ) BALLARD K.,LEFER A.,SAYERS G. Amer J Physiol 199(1960)221
- ( 24 ) BANES D. J Amer Pharm Ass Sci Ed 42(1953)669
- ( 25 ) BARTHE P.,DESAULLES P.A.,SCHÄR B.,STAEHELIN M.  
Nature(London)202(1964)908
- ( 26 ) BAULIEU E.E.,RAYNAUD J.P.,MILGROM E. Acta Endocr(Kbh)  
Suppl.147(1970)104
- ( 27 ) BAUMINGER S.,LINDNER H.R.,WEINSTEIN A. Steroids 21(1973)  
947

- ( 28) BEISEL W.R.,RAPOPORT M.I. N Eng J Med 280(1969)541
- ( 29) BERETTA-ANGUISSOLA A.,DE MARTINIS C.,NELSON D.H.  
Schweiz Med Wschr 100(1970)1677
- ( 30) BERLINER D.L.,CAZES D.M.,NABORS C.J.Jr. J Biol Chem  
237(1962)2478
- ( 31) BERMUDEZ J.A.,LIPSETT M.B. J Clin Endocrinol Metab  
34(1972)241
- ( 32) BERRY L.J.,SMYTHE D.S.,COLWELL L.S.,CHU P.H.C.  
Amer J Physiol 215(1968)587
- ( 33) BERSON S.A.,YALOW R.S. J Clin Invest 38(1959)1966
- ( 34) BERTELLINI G. Boll Chim Farm 105(1966)836
- ( 35) BIGLIERI E.G.,HERRON M.A.,BRUST N. J Clin Invest  
45(1966)1946
- ( 36) BIGLIERI E.G.,SLATON P.E.,SCHAMBELAN M.,KRONFIELD S.J.  
Amer J Med 45(1968)170
- ( 37) BIGLIERI E.G.,SCHAMBELAN M.,SLATON P.E.Jr.  
J Clin Endocrinol Metab 29(1969)1090
- ( 38) BITENSKY L.,CHAYEN J.,CUNNINGHAM G.J. Nature 199(1963)493
- ( 39) BLECHER M. Biochim Biophys Acta 93(1964)158
- ( 40) BLEDSOE T.,ISLAND D.P.,LIDDLE G.W. J Clin Invest  
45(1966)524
- ( 41) BLOMHOFF J.P. Clin Chim Acta 43(1973)257
- ( 42) BOHR D.F. Canad Med Ass J 90(1964)174
- ( 43) BOLTE D.F.,COUDERT S.,LEFEBVRE Y. J Clin Endocrinol Metab  
38(1974)394
- ( 44) BORKOWSKI A.J.,LEVIN S.,DELCROIX C. J Appl Physiol  
28(1970)42
- ( 45) BORKOWSKI A.J.,DELCROIX C.,LEVIN S. J Clin Invest  
51(1972)1664
- ( 46) BRAASCH W.,SCHMIDT H.D.,SCHMIER J. Pflügers Arch Ges  
Physiol 284(1965)240
- ( 47) BRAY G.A. Anal Biochem 1(1960)279
- ( 48) BREUER H. Z Klin Chem Klin Biochem 11(1973)357
- ( 49) BROWN J.J.,DAVIES D.L.,LEVER A.F. Brit Med J  
5417(1964)1114
- ( 50) BROWN R.D.,STROTT C.A. J Clin Endocrinol Metab 32(1971)744
- ( 51) BROWN R.D.,STROTT C.A.,LIDDLE G.W. J Clin Invest  
51(1972)1413
- ( 52) BRUNS D.L.,CONNOLLY J.E. Surg Forum 10(1960)382
- ( 53) BURSTEIN S.,ZAMOSCIANYK H.,CO N.,ADELSON M.,PRASAD D.S.M.,  
GREENBERG A.,GUT M. Biochim Biophys Acta 231(1971)223
- ( 54) BURSTEIN S.,GUT M. Rec Progr Horm Res 27(1971)303
- ( 55) BUSH I.E. Biochem J 50(1952)270

- ( 56) BUTTE J.C., KAKIHANA R., FARNHAM M.L. *Endocrinology* 92(1973)1775
- ( 57) CAMACHO A.M., MIGEON C.J. *J Clin Invest* 43(1964)1083
- ( 58) CAMERON E.H., BEYNON M.A., GRIFFITHS K.J. *Endocrinol* 41(1968)319
- ( 59) CARSTENSEN H., OERTEL G.W., EIK-NES K.B. *J Biol Chem* 234(1959)2570
- ( 60) CASPARIE A.F., BENRAAD T.J., KLOPPENBORG P.W.C., MAJOUR C.L.H. *Acta Endocrinol(Kbh)Suppl.* 119(1967)140
- ( 61) CASTRO A., BARTOS D., JELEN B. *Steroids* 22(1973)851
- ( 62) CAVINA G., MORETTI G. *J Chromatogr* 22(1966) 41
- ( 63) CAVINA G., MORETTI G., CANTAFORA A. *J Chromatogr* 80(1973) 89
- ( 64) CHEIFETZ P., GAFFUD N., DINGMAN J.F. *Endocrinology* 82(1968)1117
- ( 65) CHOBANIAN A.V., HOLLANDER W. *J Clin Invest* 41(1962)1732
- ( 66) CLERMONT H.G., WILLIAMS J.S., ADAMS J.T. *Ann Surg* 179(1974)917
- ( 67) COHN G.L. *Nature(London)* 207(1965)297
- ( 68) CONNOLLY J.E. *Lancet* 79(1959)460
- ( 69) CONOLLY J.E., BRUNS D.L., STOFER R.C. *Surg Forum* 9(1959)17
- ( 70) COOK R.P. in: *Cholesterol*, R.P. COOK(ed.) Academic Press, New York(1958)145
- ( 71) COST W.S., VEGTER J.J. *Acta Endocrinol(Kbh)* 41(1962)571
- ( 72) CUNNINGHAM C.G. *Journal A.O.A.C.* 53(1970)828
- ( 73) DAVIS J.O., OLICHNEY M.J., BROWN T.C., BINNION P.F. *J Clin Invest* 44(1965)1433
- ( 74) DAVIS J.O., HOWARDS S.S., JOHNSTON C.I., WRIGHT F.S. *Proc Soc Exp Biol Med* 27(1968)164
- ( 75) DAVIS W.W., GARREN L.D. *Biochem Biophys Res Commun* 24(1966)805
- ( 76) DAVIS W.W., BURWELL L.R., CASPER A.G.T., BARTTER F.C. *J Clin Invest* 47(1968)1425
- ( 77) DAVSON H., EGGLETON M.G. in: *Evans Principles of Human Physiology*, ed. STARLING/LOVATT, Philadelphia, Lea & Febiger, Publishers(1962)252
- ( 78) DAW J.C., LEFER A.M., BERNE R.M. *Circ Res* 22(1968)639
- ( 79) DEHENNIN L., REIFFSTECK A., SCHOLLER R. *J Steroid Biochem* 5(1974)81
- ( 80) DEMETRIOU J.A., AUSTIN F.G. *Clin Chim Acta* 33(1971)21
- ( 81) DENENBERG V.H., BRUMAGHIM J.T., HALTMEYER G.C. *Endocrinology* 81(1967)1047
- ( 82) DESHPANDE N., JENSEN V., CARSON P., BULBROOK R.D., DOOUSS T.W. *J Endocrinol* 47(1970)321

- ( 83) DE SOLDATI L.,DE FORTEZA I.E.,PELLEGATTA C.R.  
Cardiologia(Basel) 48(1966)489
- ( 84) DEXTER R.N.,FISHMAN L.M.,NEY R.L. Endocrinology 87(1970)836
- ( 85) DIEDRICHSEN G.,LOMMER D. Acta Endocr(Kbh)Suppl.173(1973)73
- ( 86) DIEDRICHSEN G.,LOMMER D. Acta Endocr(Kbh)Suppl.173(1973)74
- ( 87) DIETZMAN R.H.,CASTEDA A.R.,LILLEHEY C.W. Chest 57(1970)440
- ( 88) DI PIETRO D.L.,BROWN R.D.,STROTT C.A.  
J Clin Endocrinol Metab 35(1972)727
- ( 89) DODGE A.H. Endocrinology 87(1970)254
- ( 90) DUNN J.,SCHEVING L.,MILLET P. Amer J Physiol 223(1972)402
- ( 91) EFFER S.B.,GUPTA K.,YOUNGLAI E.V. Amer J Obstet Gynecol  
116(1973)643
- ( 92) EGDAHL R.H.,MACK E.,HERMAN A. Brit J Surg 56(1969)703
- ( 93) EGG D. J Chromatogr 86(1973)151
- ( 94) EIK-NES K.B.,SCHELLMAN J.A.,LUMRY R.,SAMUELS L.T.  
J Biol Chem 206(1954)411
- ( 95) EKINS R.P.,NEWMAN G.B.,O'RIORDAN J.L.H., in:Radioisotopes  
in Medicine:In vitro Studies,ed.R.L.HAYES,F.A.GOSWITZ,  
B.E.P.MURPHY,U.S.Atomic Energy Commission,Oak Ridge,Tenn  
(1968)59
- ( 96) ELLINGBOE J.,NYSTROM E.,SJÖVALL J. J Lipid Res 11(1970)266
- ( 97) ERLANGER B.F.,BOREK F.,BEISER S.M.,LIEBERMAN S. J Biol Chem  
234(1959)1092
- ( 98) EXLEY D.,CHAMBERLAIN J. Steroids 10(1967)509
- ( 99) FAJER A.B.,HOLZBAUER M.,NEWPORT H.M. J Physiol(London)  
214(1971)115
- (100) FALES H.M.,LUUKKAINEN T. Anal Chem 37(1965)955
- (101) FARESE R.V. in:Function of the Adrenal Cortex,ed.K.W.MC-  
KERNS,Appleton-New York(1968)Vol.1 , 539
- (102) FARRELL G.L.,RAUSHKOLB E.W.,RÖYCE P.C.,HIRSCHMANN H.  
Proc Soc Exp Biol Med 87(1954)587
- (103) FARRELL G.L.,ROSNAGLE R.S.,RAUSHKOLB E.W. Circ Res  
4(1956)606
- (104) FEDER H.H.,RESKO J.A.,GOY R.W. J Endocrinol 41(1968)563
- (105) FERGUSON W.W.,GLENN T.M.,LEFER A.M. Amer J Physiol  
222(1972)450
- (106) FIELD H.Jr.,SWELL L.,SCHOOLS P.E.,TREADWELL C.R.  
Circulation 22(1960)547
- (107) FLEGG H.M. ann Clin Biochem 10(1973)79
- (108) FLORENSA E.,SOMMERVILLE I.F. Steroids 22(1973)79
- (109) FLYNN A.,PORIES W.J.,STRAIN W.H.,HILL O.A.Jr. Science  
173(1971)1035

- (110) FRAHM J. Beitr Pathol 153(1974)262
- (111) FRANK H.A., JACOB S., WEIZEL H.A.E., REINER L., COHEN R., FINE J. Amer J Physiol 180(1955)282
- (112) FRANK H.A., FRANK E.D., KORMAN H., MACCHI I.A., HECHTER O., Amer J Physiol 182(1955)24
- (113) FU P.C. Clin Chem 20(1974)470
- (114) FUKUDA T. Nature 214(1967)107
- (115) FUKUDA T., UZAWA H. J Physiol Soc Japan 30(1968)837
- (116) FUKUDA T., FUKUDA Y.-I. Jap J Physiol 19(1969)682
- (117) FUNDER J.W., FELDMAN D., EDELMAN I.S. Endocrinology 92(1973)994
- (118) FURUYAMA S., NUGENT C.A., Steroids 17(1971)663
- (119) GANN D.S., EGDAHL R.H. J Clin Invest 44(1965)1
- (120) GANN D.S. Ann NY Acad Sci 156(1969)740
- (121) GARDINER W.L., HORNING E.C. Biochim Biophys Acta 115(1966)524
- (122) GARREN L.D., NEY R.L., DAVIS W.W. Proc Nat Acad Sci U.S.A. 53(1965)1443
- (123) GARREN L.D. Vit Horm 26(1968)118
- (124) GARREN L.D., GILL G.N., MASUI H., WALTON G.M. Rec Progr Horm Res 27(1971)433
- (125) GAUNT R., HAYS H.W. Science 88(1928)576
- (126) GLENN T.M., LEFER A.M. Circ Res 27(1970)783
- (127) GLENN T.M., LEFER A.M. Circ Res 29(1971)338
- (128) GLICK D., OCHS M.J. Endocrinology 56(1955)285
- (129) GOODFRIEND L. in: Immunologic Methods in Steroid Determination, ed. F.G. PERON, B.V. CALDWELL, Appleton-Century-Crofts, New York (1970)
- (130) GOLDER W.A., SIPPELL W.G. J Chromatogr 123(1976)293
- (131) GRAEF V., STAUDINGER H.J. Z Klin Chem Klin Biochem 8(1970)368
- (132) GRAEF V., NOWOTNY E., STAUDINGER H.J. Z Klin Chem Klin Biochem 8(1970)534
- (133) GRAHAME-SMITH D.G., BUTCHER R.W., NEY R.L., SUTHERLAND E.W. J Biol Chem 242(1967)5535
- (134) GRANGAUD R. Bull Acad Natl Med(Paris) 156(1972)250
- (135) GRANT J.K. Mem Soc Endocr 17(1968)113
- (136) GRAY M.J., STRAUSFELD K.S., WATANABE M. J Clin Endocrinol Metab 28(1968)1269
- (137) GRIFFITHS K., GLICK D. J Endocrinol 35(1966) 1
- (138) GROSS F. Klin Wschr 34(1956)929
- (139) GROSS S.J., TÖKES Z. Nature 219(1968)758

- (140) HAKSAR A., PERON F.G. *Biochem Biophys Res Commun* 47(1972)445
- (141) HAKSTIAN R.W., HAMPSON L.G., GURD F.N. *Arch Surg* 83(1961)335
- (142) HALES C.N., RANDLE P.J. *Biochem J* 88(1963)137
- (143) HALTMAYER G.C., DENENBERG V.H., THATCHER J. *Nature* 212(1966)1371
- (144) HAMI M., ROSLER A., RABINOWITZ D. *J Clin Endocrinol Metab* 40(1975)863
- (145) HARJOLA P.T., SIVULA A. *Acta Chir Scand* 132(1966)166
- (146) HART M.M., STRAW J.A. *Biochem Pharmacol* 20(1971)1679
- (147) HASAN S.H., BERSWORDT-WALLRABE VON R., NEUMANN F. *Horm Metab Res* 3, Suppl.3(1971)113
- (148) HAYANO M., SABA N., DORFMAN R.I., HECHTER O. *Rec Progr Horm Res* 12(1956)79
- (149) HAYNES R.C.Jr., BERTHET L. *J Biol Chem* 225(1957)115
- (150) HEAP R.B. *J Endocrinol* 30(1964)293
- (151) HEAP R.B., HOLZBAUER M., NEWPORT H.M. *J Endocrinol* 36(1966)159
- (152) HECHTER O. *Vit Horm* 13(1955)293
- (153) HENSCHLER D., REICH E. *Klin Wschr* 37(1959)716
- (154) HERBERT V., LAU K.S., GOTTLIEB C.W. *J Clin Endocrinol* 25(1965)1375
- (155) HERMAN A.H., MACK E.A., EGDAHL R.H. *Surg Forum* 20(1969)5
- (156) HINSBERG K.H., PELZER J., SEUKEN A. *Biochem Z* 328(1956)117
- (157) HOLLMANN G. in: *Kreislauf- und Stoffwechselprobleme bei Neugeborenen und Säuglingen*, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien(1968)
- (158) HOLLMANN G., SCHAAFF A., SCHMIDT H.D. *Z Exp Chir* 2(1969)330
- (159) HOLLMANN G., ENDEL D., KÖRNER J., FISCHER A., SCHMIDT H.D., SCHADWINKEL R. *Monatsschr Kinderheilk* 118(1970)246
- (160) HOLLMANN G. *Habilitationsschrift*, München(1971)
- (161) HOLLMANN G., URBAN A.E., SCHMIDT H.D., SOLC J., KNORR D., SUWATANAWIROY A., VARELA-CIVES L., SCHADWINKEL R. *Ann Chir Infant* 13(1972)123
- (162) HOLLMANN G., FISCHER A., JÖRNER J. *Münch Med Wschr* 116(1974)1213
- (163) HOLMDAHL T.H., SJÖVALL H. *Steroids* 18(1971)69
- (164) HOLZBAUER M., NEWPORT H.M. *J Physiol(London)* 193(1967)131
- (165) HOLZBAUER M., NEWPORT H.M. *J Physiol(London)* 198(1968)91
- (166) HOLZBAUER M. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharm Exp Path* 259(1968)177
- (167) HOLZBAUER M., BULL G., YODIM M.B. *Nature(New Biol)* 242(1973)117

- (168) HOREJSI J., SMETANA R. Acta Med Scand 155(1970)65
- (169) HORROBIN D.F. Lancet 1(1968)170
- (170) HORTH C.E., PALMER R.F. Clin Endocrinol(Oxf)1(1972)199
- (171) HOWARD J.M., DE BAKEY M.E. Surgery 30(1951)161
- (172) HUIZENGA K.A., BROFMAN B.L., WIGGERS C.J. J Pharmacol Ther 78(1943)139
- (173) HUME D.H., NELSON D.H. Surg Forum 5(1954)568
- (174) ICHII S., OKADAN., IKEDA A. Endocrinol Jap 17(1970)83
- (175) ISMAIL A.A. J Endocrinol 54(1972)IX
- (176) ISMAIL A.A., LOVE D.N., MCKINNEY R.W.J. Steroids 19(1972)689
- (177) JÄNNE O., PERHEENTUPA J., VIINIKKA L., VIHKO R. Clin Endocrinol 4(1975)39
- (178) JAMES V.H.T., ARNOLD M.L., RIPPON A.E., MARIE M. J Endocrinol 25(1972)XV
- (179) JANOFF A., WEISSMANN G., ZWEIFACH B.W., THOMAS L. J Exp Med 116(1962)451
- (180) JANOFF A. in: Shock, ed S.G. HERSHEY, Little, Brown & Co. Boston(1964)93
- (181) JEFFERSON T.A., GLENN T.M., MARTIN J.B. Proc Soc Exp Biol Med 136(1971)276
- (182) JEFFCOATE S.L. J Endocrinol 54(1972)3
- (183) JOHANNSON E.D. Acta Endocr(Kbh) 61(1969)592
- (184) JOHANNSON E.D. Acta Endocr(Kbh) Suppl.147(1970)188+
- (185) JUNGMAHN R.A., SCHWEPPE J.S. J Clin Endocrinol Metab 27(1967)1151
- (186) KAHNT F.W., MILANI A., STEFFEN H. Eur J Biochem 44(1974)243
- (187) KAPLAN N.M J Clin Invest 44(1965)2029
- (188) KARABOYAS G.C., KORITZ S.B. Biochemistry 4(1965)462
- (189) KELLERMEYER R.W., GRAHAM R.C. N Eng J Med 279(1968)754
- (190) KELLERMEYER R.W., GRAHAM R.C. N Eng J Med 279(1968)802
- (191) KELLERMEYER R.W., GRAHAM R.C. N Eng J Med 279(1968)859
- (192) KESTON A.S., UDENFRIEND S., LEVY M. J Amer Chem Soc 72(1950)748
- (193) KLOPPENBORG P.W., BENRAAD T.J., MAJOUR C.L. Nederl T Geneesk 109(1965)1178
- (194) KNAPP R.W., HOWARD J.M. Surgery 42(1957)919
- (195) KNORR D. 14. Symposion der Dtsch. Gesellschaft f. Endokrinologie, 7.-9. März 1968, Berlin-Heidelberg-New York: Springer (1968)372
- (196) KNORR D. Z Klin Chem Klin Biochem 9(1971)175
- (197) KORENMAN S.G., LIPSETT M.B. Steroids 5(1965)509

- (198) KORITZ S., PERON F.G. J Biol Chem 230(1958)343
- (199) KORITZ S., KUMAR A.M. J Biol Chem 245(1970)152
- (200) KOWAL J. Biochemistry 8(1969)1821
- (201) KOWAL J., SIMPSON E.R., ESTABROOK R.W. J Biol Chem 245(1970)2438
- (202) KRAAIPOEL R.J., DEGENHART H.J., LEFERINK J.G., VAN BEEK V., DE LEEUW-BOON H., VISSER H.K.A. FEBS Letters 50(1975)204
- (203) KRAULIS I., TRAIKOV H., LI M.P. J Steroid Biochem 3(1973)129
- (204) KRUM A.A., MORRIS M.D., BENNETT L.L. Endocrinology 74(1964)543
- (205) KUTAS M., CHUNG A., BARTOS D., CASTRO A. Steroids 20(1972)697
- (206) LADISICH W. J Neur Transmiss 36(1975)33
- (207) LAMONTAGNE N.S., JOHNSON D.F. J Chromatogr 53(1970)225
- (208) LANDAU R.L., BERGENSTAL D.M., LUGIBIHL K., KASCHT M.E. J Clin Endocrinol 15(1955)1194
- (209) LANDAU R.L., BERGENSTAL D.M., LUGIBIHL K., DIMICK D.F., RASHID E. J Clin Endocrinol 17(1957)177
- (210) LANDAU R.L., LUGIBIHL K. J Clin Endocrinol 18(1958)1236
- (211) LANDAU R.L., LUGIBIHL K. Rec Progr Horm Res 17(1961)249
- (212) LECLERCQ R., TÄLJEDAL I.B., WOLD S. Clin Chim Acta 36(1972)257
- (213) LEFER A.M., MARTIN J. Amer J Physiol 216(1969)314
- (214) LEFER A.M., VERRIER R.L. Clin Pharmacol Therap 11(1970)630
- (215) LEFKOWITZ R.J., ROTH J., PRIER W., PASTAN I. Proc Nat Acad Sci U.S.A. 65(1970)745
- (216) LEVINE S. in: Progress in Brain Research, vol. 32: Pituitary, Adrenal and the Brain, ed. D. DE WIED, W. JAWM, Elsevier Publishing Co., New York (1970) 79
- (217) LEYENDECKER G., WARDLAW S., NOCKE W. J Clin Endocrinol Metab 34(1972)430
- (218) LIDDLE G.W., CORNFIELD J., CASPER A.G.T., BARTTER F.C. J Clin Invest 34(1955)1410
- (219) LIEBERMAN S., ERLANGER B.F., BEISER S.M., AGATE F.J. Rec Progr Horm Res 15(1959)165
- (220) LILLEHEI R.C., MAC LEAN L.D. Arch Surg 78(1959)464
- (221) LILLEHEI R.C., LONGERBEAM J.K., BLOCH J.H., MANAX W.G. Ann Surg 160(1964)682
- (222) LILLEHEI R.C., MOTSAI G.J., DIETZMAN R.H. J Clin Pharmacol 5(1972)423
- (223) LIPSETT M.B., HÖKFELT B. Experientia 17(1961)449
- (224) LIPSETT M.B. Ann NY Acad Sci 179(1971)442
- (225) LLOYD C., LOBOTSKY J., BAIRD D.T., MCCracken J.A., WEISZ J., PUPKIN M., ZANARTU J., PUGA J. J Clin Endocrinol Metab 32(1971)155

- (226) LLOYD I.J., BURSTYN P.G., HORROBIN D.F.  
East Afr Med J 49(1972)403
- (227) LOMMER D., DORFMAN R.I., FORCHIELLI E.  
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 352(1971)805
- (228) LOMMER D., DORFMAN R.I., FORCHIELLI E.  
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 352(1971)1491
- (229) LOMMER D., DIEDRICHSEN G. Acta Endocr(Kbh)Suppl.177(1973)314
- (230) LONGCOPE C., WILLIAMS R.H. Endocrinology 72(1963)735
- (231) LOVELOCK J.E., LIPSKY S.R. J Amer Chem Soc 82(1960)431
- (232) LUISI M., FRANCHI F., SIMONINI N. Horm Res 4(1973)74
- (233) LURIE A.O., PATTERSON R.J. Clin Chem 16(1970)856
- (234) MACK E., EGDAHL R.H. Surg Gynec Obstet 131(1970)65
- (235) MACKENZIE D.D.S. Aust J Exp Biol Med Sci 46(1968)273
- (236) MAHAFFEE D., REITZ R.C., NEY R.L. J Biol Chem 249(1974)227
- (237) MAJOOR C.L. N Eng J Med 279(1968)1172
- (238) MARESCOTTI V. in: Gaschromatographic Determination of hormonal steroids, ed. POLVANI/SURACE/LUISI, Academic Press, London (1967)237
- (239) MASON P.A., FRASER R. J Endocrinol 64(1975)277
- (240) MATZKU S., LUDWIG R., RAPP W. Clin Chim Acta 54(1974)317
- (241) MCEVOY D., MUSCHEK L.D., RABINOWITZ J.L. Steroids 12(1968)183
- (242) MELBY J.C. Med Clin North Am 45(1961)875
- (243) MIDGLEY A.R. Jr., REBAR R.W., NISWENDER G.D. Acta Endocr(Kbh) Suppl.142(1969)247
- (244) MIKHAIL G., ZANDER J., ALLEN W.M. J Clin Endocrinol 23(1963)1267
- (245) MORRIS M.D. J Biol Chem 234(1959)1095
- (246) MOSES H.L., DAVIS W.W., ROSENTHAL A.S. Science 163(1969)1203
- (247) MOSTAFAPOUR M.K., TCHEN T.T. J Biol Chem 248(1973)6674
- (248) MOTSAY G.J., ALHO A., JAEGER T. Fed Proc 29(1970)1861
- (249) MÜLLER J. Acta Endocr(Kbh)52(1966)515
- (250) MULROW P.J., COHN G.L. J Clin Invest 40(1961)1250
- (251) MULROW P.J., GANONG W.F. Circulation 25(1962)213
- (252) MURPHY B.E.P. J Clin Endocrinol 27(1967)973
- (253) MURPHY B.E.P. Acta Endocr(Kbh)Suppl.147(1970)37
- (254) MURPHY B.E.P. Nature(New Biol)232(1971)21
- (255) NAGY S., TARNOKY K., PETRI G. J Surg Res 4(1964)62
- (256) NAGY S., TARNOKY K., PETRI G. Acta Physiol Acad Sci Hung 27(1965)257
- (257) NAGY S., TARNOKY K., PETRI G. Eur Surg Res 2(1970)333
- (258) NEILL J.D., JOHANNSON E.D., DATTA J.K.  
J Clin Endocrinol Metab 27(1967)1167

- (259) NELSON D.H.,SAMUELS L.T. J Clin Endocrinol 12(1952)519
- (260) NELSON D.H.,HUME D.M. Endocrinology 57(1955)184
- (261) NEW M.I.,SEAMAN M.P. J Clin Endocrinol Metab 30(1970)361
- (262) NIESCHLAG E.,WICKINGS E.J. Z Klin Chem Klin Biochem 13(1975)261
- (263) NISHINA T.,TSUJI A.,FUKUSHIMA D.K. Steroids 24(1974)861
- (264) NISWENDER G.D. in: Immunologic Methods in Steroid Determination,ed F.G.PERON,B.V.CALDWELL,Appleton-Century-Crofts, New York(1970)149
- (265) NISWENDER G.D. Steroids 22(1973)413
- (266) NISWENDER G.D. in:Hormone Action A.Steroid Hormones.Hormone binding proteins and assays for steroid hormones. Methods in Enzymol 36(1974)16
- (267) NORUM K.R. Scand J Clin Lab Invest 33 Suppl.(1974)7
- (268) NYSTRÖM E.,SJÖVALL J. Anal Biochem 12(1965)235
- (269) OCHI Y.,SHIOMI K.,HACHIYA T. Endocrinol Jap 20(1973)1
- (270) O'CONNELL J.M.,BOONSHAFT B.,HAYES J.M. Proc Soc Exp Biol Med 132(1969)862
- (271) ODDIE C.J.,COGHLAN J.P.,SCOGGINS B.S. J Clin Endocrinol Metab 34(1972)1039
- (272) ODELL W.D.,ABRAHAM G.,RANDAR RAUD H.,SWERDLOFF R.S., FISHER D.A. Acta Endocr(Kbh)Suppl.141(1969)54
- (273) OELKERS W.,SCHÖNESHÖFER M.,BLÜMEL A. J Clin Endocrinol Metab 39(1974)882
- (274) OJI N.,SHREEVE W.W. Endocrinology 78(1966)765
- (275) OMURA T. Arch Biochem Biophys 117(1966)660
- (276) OSTWALD R.,SHANNON A.,MILJANICH P. J Nutr 82(1964)443
- (277) PANG C.N.,JOHNSON D.C. Steroids 23(1974)203
- (278) PARKER C.W. Prog Clin Pathol 4(1972)103
- (279) PASTAN I.,ROTH J.,MACCHIA V. Proc Nat Acad Sci U.S.A. 56(1966)1802
- (280) PEARLMUTTER A.F.,RAPINO E.,SAFFRAN M. Endocrinology 92(1973)679
- (281) PERON F.G.,DORFMAN R.I. J Biol Chem 223(1956)877
- (282) PERON F.G.,GUERRA F.,MCCARTHY J.L. Biochim Biophys Acta 110(1965)277
- (283) PERON F.G.,MCCARTHY J.L.,GUERRA F. Biochim Biophys Acta 117(1966)450
- (284) PETRI G. Surg Forum 14(1963)18
- (285) PETTINGER W.A.,MARCHELLE M.,AUGUSTO L. Amer J Physiol 221(1971)1071
- (286) PION R.,JAFJE R.,ERIKSSON G.,WIKVIST N ,DICZFALUSY E. Acta Endocr(Kbh)48(1965)234
- (287) PIZARRO M.A.,KOLANOWSKI J. J Steroid Biochem 3(1972)349

- (288) POWELL J.E., STEVENS V.C. Clin Chem 19(1973)210
- (289) RAPP J.P., EIK-NES K.B. Anal Biochem 15(1966)386
- (290) RASMUSSEN H., TENENHOUSE A. Proc Nat Acad Sci U.S.A. 59(1968)1364
- (291) RATSIMAMANGA-URVERG S. C R Acad Sci(D)Paris 264(1967)730
- (292) RATSIMAMANGA-URVERG S., NIGEON-DUREUIL M., RATSIMAMANGA A.R. C R Acad Sci(D)Paris 269(1969)2574
- (293) REDGATE E.S. Endocrinology 80(1967)741
- (294) REDMOND A.F., KOSTYO J.L. Endocrinology 86(1970)440
- (295) REECE W.O. Amer J Vet Res 33(1972)1493
- (296) REEVES B.D., CALHOUN D.W. Acta Endocr(Kbh)Suppl.147(1970)61+
- (297) REEVES B.D., DE SPUZA M.L.A., THOMPSON I.E., DICZFALUSY E. Acta Endocr(Kbh)63(1970)225
- (298) REICHSTEIN T., VON EUW J. Helv Chim Acta 21(1938)1197
- (299) REPLOGLE R.L., KUNDLER H., SCHOTTENFIELD M. Ann Surg 174(1971)126
- (300) RHODIN J.A.G. Ultrastruct Res 34(1971)23
- (301) RICHMOND W. Clin Chem 19(1973)1350
- (302) RICHMOND W. Clin Sci Mol Med 46(1974)6 P
- (303) RICHMOND W. Z Klin Chem Klin Biochem 12(1974)226
- (304) RIONDEL A., TAIT J.F., TAIT S.A., GUT M., LITTLER B. J Clin Endocrinol 25(1965)229
- (305) ROBB C.A., DAVIS J.O., JOHNSTON C.I. Amer J Physiol 216(1969)884
- (306) ROBERTS H.R. J Pharm Sci 51(1962)794
- (307) RODBARD D., RAYFORD P.L., COOPER J., ROSS G.T. J Clin Endocrinol 29(1968)352
- (308) RODBARD D., BRIDSON W., RAYFORD P.L. J Lab Clin Med 74(1969)770
- (309) RODBARD D. Clin Chem 20(1974)1255
- (310) ROESCHLAU P., BERNT E., GRUBER W. Z Klin Chem Klin Biochem 12(1974)226
- (311) RONDELL P., GROSS F. Helv Physiol Pharmacol Acta 18(1960)1
- (312) ROSEN F. Program of the 52nd Meeting. The Endocrine Society (1970)Abstr.143
- (313) ROSSELIN G., ASSAN R., YALOW R.S. Nature 212(1966)355
- (314) ROTH D.G., GAMBLE J.L.Jr. Amer J Physiol 208(1965)90
- (315) ROTH J., GLICK S.M., KLEIN L.A., PETERSEN M.J. J Clin Endocrinol 26(1966)671
- (316) ROUSER G. J Chromatogr Sci 11(1973)60
- (317) ROUSSEAU G., BAXTER J.D., FUNDER J.W. J Steroid Biochem 3(1972)219
- (318) RUNNEBAUM B., VAN DER MOLEN H., ZANDER J. Steroids Suppl.2(1965)189+

- (319) RYAN K.J., SMITH O.W. J Biol Chem 236(1961)710
- (320) RYAN K.J., SMITH O.W. Rec Progr Horm Res 21(1965)367
- (321) SAMBHI M.P., WEIL M.H., UDHOJI V.N., SHUBIN H.  
Int Anesth Clin 2(1964)421
- (322) SAVARD K., MARSH J.M., RICE B.F.  
Rec Progr Horm Res 21(1965)285
- (323) SAYERS G., SAYERS M.A., LEWIS H.L., LONG C.N.H.  
Yale J Biol Med 16(1944)361
- (324) SAYERS G., SAYERS M.A. Rec Progr Horm Res 2(1946)81
- (325) SAYERS G., SAYERS M.A. Endocrinology 40(1947)265
- (326) SAYERS G. Physiol Rev 30(1950)241
- (327) SAYERS G., SOLOMON N. Endocrinology 66(1960)719
- (328) SCATCHARD G Ann NY Acad Sci 51(1949)660
- (329) SCHATZ A. J Bacteriol 58(1949)
- (330) SCHAUER A., GIELOW L. Naturwiss 54(1967)589
- (331) SCHWEVING L.E., PAULY J.E. Amer J Physiol 210(1966)1112
- (332) SCHMID P.G., ECKSTEIN J.W., ABOUD F.M.  
J Clin Invest 46(1967)590
- (333) SCHNACKENBURG VON K., BIDLINGMAIER F., KNORR D.  
Monatsschr Kinderheilk 122(1974)622
- (334) SCHUBERT K., WEHRBERGER K., GONTSCHAROW N.P.  
Acta Biol Med German 18(1967)663
- (335) SCHUMER W. Arch Surg 98(1969)259
- (336) SCHUMER W., NYHUS L.M. Surg Clin 49(1969)147
- (337) SCHWYZER R. Ann Rev Biochem 33(1964)259
- (338) SCRIBA P.C., REDDY W.J. Endocrinology 76(1965)745
- (339) SEKI T. J Chromatogr 27(1967)423
- (340) SEKI T. Endocrinol Jap 13(1966)75
- (341) SENDEREY S. Rev Argent Endocr 8(1962)61
- (342) - Sephadex LH 20. Chromatography in organic solvents  
Pharmacia Fine Chemicals(1970)
- (343) - Sephadex. Gel filtration in theory and practice  
Pharmacia Fibe Chemicals(1971)
- (344) SETH K., NOWACZYNSKI W., KUCHEL O., MANCHENO-RICO E., GENEST J.  
Can J Biochem 50(1972)136
- (345) SHAEFER J.M., GANS J.H. Endocrinology 90(1972)787
- (346) SHARMA R.K., HASHIMOTO K., KITABCHI A.  
Endocrinology 91(1972)994
- (347) SHEMESH M., LINDNER H.R., AYALON N.  
J Reprod Fertil 26(1971)167
- (348) SHIMA S., MITSUNUGA M., NAKAO T. Endocrinology 90(1972)808
- (349) SHORT R.V. J Endocrinol 16(1958)415

- (350) SIMPSON E.R., BOYD G.S. *Biochem Biophys Res Commun* 28(1967)945
- (351) SIMPSON E.R., BOYD G.S. *Eur J Biochem* 2(1967)275
- (352) SIMPSON E.R., JEFFCOATE C.R., BOYD G.S. *FEBS Letters* 15(1971)345
- (353) SIMPSON E.R., TRZECIAK W.H., MCCARTHY J.L. *Biochem J* 129(1972)10 P
- (354) SINTERHAUF K., HERZOG P., DIEDRICHSEN G., LOMMER D. *Klin Wschr* 52(1974)816
- (355) SINTERHAUF K., HERZOG P., DIEDRICHSEN G., LOMMER D. *Klin Wschr* 52(1974)1103
- (356) SIPPELL W.G., LEHMANN P., HOLLMANN G. *J Chromatogr* 108(1975)305
- (357) SIPPELL W.G., GOLDER W.A., HAHN H., LEHMANN P. *Pediatr Res* 9(1975)674
- (358) SJÖSTRAND T. *Arch Scand Physiol* 68(1934)160
- (359) SKELLEY D.S., BROWN L.P., BESCH P.K. *Clin Chem* 19(1973)146
- (360) SKINNER S.L., LUMBERS E.R., SYMONDS E.M. *Clin Sci* 36(1969)67
- (361) SOLOMON N., TRAVIS R.H., SAYERS G. *Endocrinology* 64(1959)535
- (362) SOMMERVILLE I.F., PICKETT M.T., COLLINS W.P., DENYER D.C. *Acta Endocr(Kbh)* 43(1963)101
- (363) SPATH J.A.Jr., GORCZYNSKI R.J., LEFER A.M. *Surg Gynecol Obstet* 137(1973)597
- (364) SPIELMAN W.S., DAVIS J.O. *Circ Res* 35(1974)615
- (365) SPINK W.W., VICK J. *Circ Res* 9(1961)184
- (366) SPINK W.W., VICK J. *Proc Soc Exp Biol Med* 107(1961)777
- (367) STADTMAN T.C., CHERKES A., ANFINSEN C.B. *J Biol Chem* 206(1954)511
- (368) - Standardization of radioimmunoassay procedures. Report of an International Agency Panel. *Int J Appl Radiat Isotop* 25(1974)145
- (369) STEWART-BENTLEY M., HORTON R. *J Clin Endocrinol Metab* 33(1971)542
- (370) STONE D., HECHTER O. *Arch Biochem* 51(1954)547
- (371) STONE S., KHARMA K.M., NAKAMURA R.M., MISHILL D.R., THORNEY-CROFT I.H. *Steroids* 18(1971)161
- (372) STROTT C.A., LIPSETT M.B. *J Clin Endocrinol* 28(1968)1426
- (373) STROTT C.A., YOSHIMI T., ROSS G.T. *J Clin Endocrinol* 29(1969)1157
- (374) STROTT C.A., YOSHIMI T., LIPSETT M.B. *J Clin Invest* 48(1969)930
- (375) STROTT C.A., BERMUDEZ J.A., LIPSETT M.B. *J Clin Invest* 49(1970)1999

- (376) STROTT C.A. in: Hormone Action A. Steroid Hormones. Hormone binding proteins and assays for steroid hormones. Methods in Enzymol 36(1974)34
- (377) SULIMOVICI S.I., BOYD G.S. Vit Horm 27(1969)199
- (378) SUNDSFJORD J.A., AAKVAAG A. Acta Endocr(Kbh)64(1970)452
- (379) SUNDSFJORD J.A. Acta Endocr(Kbh)67(1971)174
- (380) SUNDSFJORD J.A. Acta Endocr(Kbh)67(1971)483
- (381) SUNDSFJORD J.A. Acta Endocr(Kbh)73(1973)499
- (382) SWEAT M. Anal Chem 26(1954)773
- (383) SWEETLEY C.C., HORNING E.C. Nature(London)187(1960)144
- (384) SWELL L., DAILEY R.E., TREADWELL C.R. Proc Soc Exp Biol Med 119(1965)71
- (385) SYMBAS P.N., ABBOTT O.A., ENDE N. Surgery 61(1967)221
- (386) SZABO D., GLAZ E., KELEMEN J. Histochemie 38(1974)213
- (387) TAMAOKI B. J Steroid Biochem 4(1973)89
- (388) TAN S.Y., MULROW P.J. Steroids 25(1975)1
- (389) TAUNTON O.D., ROTH J., PASTAN I. J Biol Chem 244(1969)247
- (390) TAYLOR A.A., DAVIS J.O., JOHNSON J.A. Amer J Physiol 223(1972)466
- (391) TELIVUO L., LOUHIMO I. Acta Anaesth Scand 10(1965)1
- (392) TRZECIAK W.H., BOYD G.S. Eur J Biochem 37(1973)327
- (393) TURFITT G.E. Biochem J 38(1944)492
- (394) UMBERGER E.J. Anal Chem 27(1955)768
- (395) URQUHART J., LI C.C. Amer J Physiol 214(1968)73
- (396) VAN DEN HEUVEL W.J.A., SWEETLEY C.C., HORNING E.C. J Amer Chem Soc 82(1960)3481
- (397) VAN DEN HEUVEL W.J.A., CREECH B.G., HORNING E.C. Anal Biochem 4(1962)191
- (398) VAN DER MOLEN H.J., GROEN D.J. J Clin Endocrinol Metab 25(1965)1625
- (399) VAN OSS C.J. in: Principles of Immunology, ed. N.R. ROSE, F. MILGROM, C.J. VAN OSS, Macmillan, New York(1973)11
- (400) VARSANO-AHARON N., ULICK S. J Clin Endocrinol Metab 38(1974)486
- (401) VECSEI P., LOMMER D., STEINACKER H.G. Acta Endocr(Kbh)53(1966)24
- (402) VLADUTIU A. Rev Roum Physiol 8(1971)183
- (403) VOGT W., POPP P., KNEDEL M. Z Klin Chem Klin Biochem 11(1973)438
- (404) WATSON D.J., ROMANOFF E.B., KATO J., BARTOSIK D.B. Anal Biochem 20(1967)233
- (405) WEIL M.H., WHIGHAM H. Amer J Physiol 209(1965)815
- (406) WEIR R.J. Lancet 1(1971)467

- (407) WEISSMAN G., THOMAS L. J Exp Med 116(1962)433
- (408) WEISSMAN G., THOMAS L. Rec Progr Horm Res 20(1964)215
- (409) WELIKY I., ENGEL L.L. J Biol Chem 238(1963)1302
- (410) WERBIN H., CHAIKOFF I.L. Arch Biochem Biophys 93(1961)476
- (411) WEST C.D., MAHAJAN D.K., CHAVRE D.J.  
J Clin Endocrinol Metab 36(1973)1230
- (412) WESTPHAL U. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 346(1966)243
- (413) WHITEHOUSE B.J., VINSON G.P. Acta Endocr(Kbh)68(1971)467
- (414) WIEST W.G. Steroids 10(1967)257
- (415) WILSON A., FRASER R. J Endocrinol 51(1971)557
- (416) WINER B.M. J Clin Invest 44(1965)1112
- (417) WISE T.H., SORENSEN A.M.Jr., FLEEGER J.L.  
Steroids 26(1975)17
- (418) WOMBACHER H., KÖRBER F. Z Klin Chem Klin Biochem 10(1972)260
- (419) WOOLEVER C.A. Amer J Obstet Gynec 85(1963)981
- (420) WYMAN H., SOMMERVILLE I.F. Steroids 12(1968)63
- (421) YOUSSEFNEJADIAN E., FLORENSA E., COLLINS W.P.  
Steroids 20(1972)773
- (422) YOSHIMI T., LIPSETT M.B. Steroids 11(1968)527
- (423) ZANDER J., SIMMER H. Klin Wschr 32(1954)529
- (424) ZAPATA-ORTIZ V., DE LA MATA C.R.  
Arzneimittelforsch 12(1962)953
- (425) ZARROW M.X., HALTMEYER G.C., DENENBERG C.H.  
Endocrinology 79(1966)631
- (426) ZETTNER A. Clin Chem 19(1973)699
- (427) ZETTNER A., DULY P.E. Clin Chem 20(1974)5
- (428) ZIMMERING P.E., BEISER S.M., ERLANGER B.F.  
J Immunol 95(1965)262
- (429) ZUCCARELLO W.A., FRISHMUTH G.J., RICE E.G.  
Steroids 23(1974)443
- (430) ZWEIFACH B.W. Fed Proc 20, Suppl.9(1961)118

## 6.2. VERZEICHNIS DER TABELLEN

Seite

|         |                                                                                                                                                                |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab. 1  | Intrazelluläre Verteilung der Enzyme der NNR-Steroidogenese .....                                                                                              | 3  |
| Tab. 2  | Ursachen von RIA-Blanks .....                                                                                                                                  | 32 |
| Tab. 3  | Literaturauswahl zu den gebräuchlichen Methoden der Bestimmung von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron .....                                                | 36 |
| Tab. 4  | Wiederfindungsraten von $^3\text{H}$ -Progesteron, $^3\text{H}$ -DOC und $^3\text{H}$ -17-OH-Progesteron nach Routineextraktion mit Dichlormethan .....        | 63 |
| Tab. 5  | Wiederfindungsraten von $^3\text{H}$ -Progesteron, $^3\text{H}$ -DOC und $^3\text{H}$ -17-OH-Progesteron bei fraktionierter Extraktion mit Dichlormethan ..... | 64 |
| Tab. 6  | Wiederfindungsraten von $^3\text{H}$ -Progesteron, $^3\text{H}$ -DOC und $^3\text{H}$ -17-OH-Progesteron nach Extraktion mit Petroläther und n-Hexan .....     | 64 |
| Tab. 7  | Elutionsgrenzen und Elutionsvolumina verschiedener Corticosteroide auf den Säulen der 1. Chromatographie .                                                     | 66 |
| Tab. 8  | Elutionsdaten von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron, Androstendion und Testosteron auf den Säulen der 2. Chromatographie .....                            | 69 |
| Tab. 9  | Wiederfindungsraten von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron nach Extraktion und erster Chromatographie .....                                                | 74 |
| Tab. 10 | Wiederfindungsraten von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron nach Extraktion + 1. Chromatographie + 2. Chromatographie .....                                 | 74 |
| Tab. 11 | Wiederfindungsraten von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron nach Extraktion + 1. Chromatographie + 2. Chromatographie, nach Säulen aufgeschlüsselt .....    | 75 |
| Tab. 12 | Bindungsverhältnisse der Tracersubstanzen in den RIA-Standardkurven von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron .....                                           | 81 |
| Tab. 13 | Kreuzreaktion der in den Radioimmunoassays verwendeten Anti-Steroid-Antikörper .....                                                                           | 85 |
| Tab. 14 | Reproduzierbarkeit der Steroid-Radioimmunoassays ...                                                                                                           | 92 |
| Tab. 15 | Statistische Daten zur Qualitätskontrolle der enzymatischen Cholesterinbestimmung .....                                                                        | 95 |
| Tab. 16 | Individual- und schockexperimentelle Daten der Versuchstiere .....                                                                                             | 96 |
| Tab. 17 | Plasmakonzentrationen von Progesteron bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....                                                                          | 97 |
| Tab. 18 | Plasmakonzentrationen von Progesteron bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....                                                                        | 98 |
| Tab. 19 | Plasmakonzentrationen von Progesteron bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....                                                                        | 99 |

|         |                                                                                                                                               |     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tab. 20 | Plasmakonzentrationen von DOC bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....                                                                 | 103 |
| Tab. 21 | Plasmakonzentrationen von DOC bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....                                                               | 104 |
| Tab. 22 | Plasmakonzentrationen von DOC bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....                                                               | 105 |
| Tab. 23 | Plasmakonzentrationen von 17-OH-Progesteron bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....                                                   | 108 |
| Tab. 24 | Plasmakonzentrationen von 17-OH-Progesteron bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....                                                 | 109 |
| Tab. 25 | Plasmakonzentrationen von 17-OH-Progesteron bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....                                                 | 110 |
| Tab. 26 | Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....                                                   | 113 |
| Tab. 27 | Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....                                                 | 114 |
| Tab. 28 | Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....                                                 | 115 |
| Tab. 29 | Plasmakonzentrationen von freiem Cholesterin bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....                                                  | 118 |
| Tab. 30 | Plasmakonzentrationen von freiem Cholesterin bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....                                                | 119 |
| Tab. 31 | Plasmakonzentrationen von freiem Cholesterin bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....                                                | 120 |
| Tab. 32 | Plasmakonzentrationen von verestertem Cholesterin bei den Versuchstieren der Kontroll- und der Therapiegruppen 1 und 2 .....                  | 122 |
| Tab. 33 | Plasmaquotienten freies Cholesterin / Gesamtcholesterin bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe und der Therapiegruppen 1 und 2 .....       | 124 |
| Tab. 34 | Plasmaquotienten freies Cholesterin / verestertes Cholesterin bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe und der Therapiegruppen 1 und 2 ..... | 125 |

6.3. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Seite

|         |                                                                                                                                                                    |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1  | Reaktionsmechanismus der Steroidhydroxylierung in der NNR .....                                                                                                    | 4  |
| Abb. 2  | Lokalisation enzymatischer Reaktionen in steroidproduzierenden Organen .....                                                                                       | 5  |
| Abb. 3  | Die Steroidogenese in der NNR .....                                                                                                                                | 6  |
| Abb. 4  | Molekularer Wirkmechanismus des ACTH .....                                                                                                                         | 8  |
| Abb. 5  | Schematische Darstellung des Schockversuchs .....                                                                                                                  | 40 |
| Abb. 6  | Chromatographie - Säulen mit Vorratsgefäßen .....                                                                                                                  | 43 |
| Abb. 7  | Schematische Darstellung der Steroidanalyse .....                                                                                                                  | 57 |
| Abb. 8  | Typisches Elutionsmuster von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron in der 1.Chromatographie .....                                                                 | 65 |
| Abb. 9  | Typisches Elutionsmuster von Androstendion, Testosteron, Corticosteron, Aldosteron, Cortison und Cortisol auf den Säulen der 1.Chromatographie .....               | 67 |
| Abb. 10 | Typisches Elutionsmuster von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron in der 2.Chromatographie .....                                                                 | 68 |
| Abb. 11 | Reproduzierbarkeit des Elutionsmusters der vereinigten Peaks von Progesteron und DOC sowie von 17-OH-Progesteron auf verschiedenen Säulen der 1.Chromatographie .. | 70 |
| Abb. 12 | Reproduzierbarkeit des Elutionsmusters von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron auf verschiedenen Säulen der 2.Chromatographie .....                             | 72 |
| Abb. 13 | Verschiebung des Elutionsmusters von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron auf den Säulen der 2.Chromatographie nach mehrmaliger Benützung der Säulen .....       | 73 |
| Abb. 14 | Progesteron-RIA Standardkurve 0 - 500 pg und Standardkurve 0 - 100 pg .....                                                                                        | 77 |
| Abb. 15 | DOC-RIA Standardkurve 0 - 400 pg und Standardkurve 0 - 100 pg .....                                                                                                | 78 |
| Abb. 16 | 17-OH-Progesteron-RIA Standardkurve 0 - 500 pg und Standardkurve 0 - 100 pg .....                                                                                  | 78 |
| Abb. 17 | Schwankungen der Nullwertbindung innerhalb einer Reihe von Radioimmunoassays für Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron .....                                      | 79 |
| Abb. 18 | Schwankungen der Steroidmengen, die 50 % des AK-gebundenen Tracersteroids von den Bindungsstellen am Antikörper verdrängen .....                                   | 80 |
| Abb. 19 | Vertrauensbereiche ( 99% ) für den Prozentanteil des gebundenen <sup>3</sup> H-Steroids an den verschiedenen Punkten der RIA-Standardkurven .....                  | 82 |

|         |                                                                                                   |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 20 | Regressionsgeraden typischer Standardkurven von Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron .....      | 84  |
| Abb. 21 | Graphische Darstellung der Kreuzreaktionen des Anti-Progesteron-Antikörpers Biolab .....          | 86  |
| Abb. 22 | Graphische Darstellung der Kreuzreaktionen des Anti-DOC-Antikörpers 24 .....                      | 87  |
| Abb. 23 | Graphische Darstellung der Kreuzreaktionen des Anti-17-OH-Progesteron-Antikörpers 140 .....       | 88  |
| Abb. 24 | Testung der Antikörper-Titer .....                                                                | 89  |
| Abb. 25 | Prüfung der in den RIA verwendeten Antikörper:<br>Scatchard-Plot, Michaelis-Menten-Diagramm ..... | 91  |
| Abb. 26 | Richtigkeit der Steroid-Radioimmunoassays .....                                                   | 93  |
| Abb. 27 | Plasmakonzentrationen von Progesteron bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....             | 97  |
| Abb. 28 | Plasmakonzentrationen von Progesteron bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....           | 98  |
| Abb. 29 | Plasmakonzentrationen von Progesteron bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....           | 99  |
| Abb. 30 | Progesteron bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock .....                      | 100 |
| Abb. 31 | Plasmakonzentrationen von DOC bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....                     | 103 |
| Abb. 32 | Plasmakonzentrationen von DOC bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....                   | 104 |
| Abb. 33 | Plasmakonzentrationen von DOC bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....                   | 105 |
| Abb. 34 | DOC bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock .....                              | 106 |
| Abb. 35 | Plasmakonzentrationen von 17-OH-Progesteron bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....       | 108 |
| Abb. 36 | Plasmakonzentrationen von 17-OH-Progesteron bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....     | 109 |
| Abb. 37 | Plasmakonzentrationen von 17-OH-Progesteron bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....     | 110 |
| Abb. 38 | 17-OH-Progesteron bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock .....                | 111 |
| Abb. 39 | Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....       | 113 |
| Abb. 40 | Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....     | 114 |
| Abb. 41 | Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....     | 115 |

|                                                                                                                                                                                                                                               | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Abb. 42 Gesamtcholesterin bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock .....                                                                                                                                                    | 116   |
| Abb. 43 Plasmakonzentrationen von freiem Cholesterin bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe .....                                                                                                                                          | 118   |
| Abb. 44 Plasmakonzentrationen von freiem Cholesterin bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 1 .....                                                                                                                                        | 119   |
| Abb. 45 Plasmakonzentrationen von freiem Cholesterin bei den Versuchstieren der Therapiegruppe 2 .....                                                                                                                                        | 120   |
| Abb. 46 Freies Cholesterin bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock .....                                                                                                                                                   | 121   |
| Abb. 47 Verestertes Cholesterin bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock .....                                                                                                                                              | 123   |
| Abb. 48 Cholesterinquotienten bei Hundewelpen im standardisierten hämorrhagischen Schock .....                                                                                                                                                | 126   |
| Abb. 49 Synopsis der Meßwerte für Gesamtcholesterin, freies Cholesterin, Progesteron, DOC und 17-OH-Progesteron im peripheren Plasma der Hundesäuglinge zur Kontrollzeit und während der oligämischen Phase des hämorrhagischen Schocks ..... | 144   |

### Mein Dank gilt

Herrn Privatdozent Dr.G.Hollmann für die Überlassung des Themas und die mir gewährte Selbständigkeit bei der experimentellen Arbeit,

Herrn Professor Dr.W.Ch.Hecker für die Möglichkeit der Promotion an seiner Klinik,

Herrn Dr.W.G.Sippell für umfangreiche praktische Anleitung und vertrauensvolle Zusammenarbeit

Dem Sonderforschungsbereich 147 für finanzielle Unterstützung,

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Jutta Kronauer, Gisela Putz und Marianne Scheuerecker für tatkräftige Mitarbeit,

Den Kondoktoranden Henning Becker, Thomas Brünig, Helmut Dörr, Helmut Hahn und Peter Lehmann für den kollegialen Arbeitsgeist und meiner Frau , die sämtliche Abbildungen angefertigt hat, für diese und alle weitere Hilfe .

## L E B E N S L A U F

Ich wurde am 25. Juli 1951 als Sohn des Regierungsdirektors Karl Golder und seiner Ehefrau Irmgard Golder, geb. Lorz, in München geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Deggen-dorf, München und Passau trat ich im Herbst 1961 in das Hu-manistische Gymnasium Leopoldinum in Passau ein und legte dort im Juni 1970 das altsprachliche Abitur ab.

Das Studium der Humanmedizin absolvierte ich zwischen 1970 und 1976 an der Medizinischen Fakultät ( jetzt Fachbereich Medizin ) der Ludwig-Maximilians-Universität München . Die vorklinischen Semester schloß ich mit dem Physikum im Früh-jahr 1973, die klinischen Semester mit dem Staatsexamen im Sommer 1976 ab. Von Sommer 1973 bis Sommer 1975 war ich im Experimentell-Chirurgischen Labor der Kinderchirurgischen Klinik der Universitäts-Kinderklinik München praktisch tätig.

Seit Mitte August 1976 arbeite ich als Medizinalassistent im Zentralkrankenhaus Gauting der LVA Oberbayern .





